

EFFECTOS DE UN EXTRACTO ETANOLICO DE *Cannabis sativa*, SOBRE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO DE LA RATA

J. MAURICIO M. HERRERA C., ALEJANDRA CRUZ D., ALINA URIBE G., JOSÉ L. SALDAÑA M., PAOLA GARCÍA P., y SERGIO CADENA C.

Carrera de Biología, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México 54090, México

Versión Final: Mayo 29, 1998

Resumen. Los efectos de un extracto etanolico de *Cannabis sativa*, sobre la contracción del músculo Gastrocnemio de la rata, fueron estudiados tomando en cuenta dentro de estos la posible interacción del **D⁹-THC** (que es el principio activo de esta planta) con el Propilenglicol como vehículo de administración. Se realizaron registros de fatiga muscular, durante los cuales se aplicó el extracto con dosis altas (4 mg/kg) y bajas (0.5 mg/kg) de **D⁹-THC**, así como del vehículo puro, para poder medir la posible interacción. Los datos fueron comparados con un grupo Control, el cual no recibió ningún tratamiento durante los registros.

El **D⁹-THC** en la dosis alta, produjo un incremento de la respuesta muscular en comparación con el grupo Control, a su vez este efecto es potenciado por las dosis altas del vehículo. En cuanto a las dosis bajas también se produjo un incremento pero en menor escala, que no fue potenciado por dosis bajas del vehículo. Aparentemente, el Propilenglicol utilizado como vehículo de administración del **D⁹-THC**, produce un efecto aditivo sobre la respuesta muscular, tan solo administrándose en dosis altas.

Palabras clave: Δ^9 -Tetrahidrocannabinol - Músculo Esquelético - Gastrocnemio - Respuesta muscular - Fatiga muscular - Acetilcolina - Placa motora.

INTRODUCCIÓN

La Marihuana (*Cannabis sativa*), es una de las plantas cuyo cultivo se considera dio origen a la agricultura y que más se ha extendido por el mundo. La Marihuana, que es conocida con una infinidad de nombres dependiendo de su ubicación geográfica, posee diversas cualidades medicinales y terapéuticas, y además se ha utilizado en cultos religiosos en casi todo el mundo, desde los antiguos chinos y persas, hasta los griegos (Bowman, 1984). Por su uso como droga, su cultivo esta prohibido y al año son quemadas cientos de toneladas de esta.

Hoy en día, innumerables estudios realizados en el mundo, confirman las cualidades terapéuticas de esta, como analgésico, estimulante del apetito, anticonvulsionante, antiespasmódico, antidepressivo, tranquilizante, anestésico local, broncodilatador, etc., además de que no origina una dependencia física notable, si es utilizada correctamente y con fines meramente terapéuticos (Grinspoon, 1995). Se ha mencionado que su principio activo, el **D⁹-Tetrahidrocannabinol**, que es el principal componente psico-activo de esta planta, posee una actividad analgésica y anti-inflamatoria (Mechoulam, 1968), lo cual pudiera tener un efecto sobre la capacidad motora del músculo esquelético, debido a esto es que se plantea su reutilización y reconsideración con fines benignos, quizás como un medicamento de uso a nivel muscular.

Se han estudiado diferentes mecanismos del **D⁹-THC**: en dosis bajas, como un antagonista de los efectos de la *Prostaglandina E₁*, la cual disminuye la motilidad intestinal en el ratón (Jackson *et al.*, 1976); y en dosis altas, como un antagonista de la *d-Anfetamina*, la cual incrementa la actividad motora de las ratas (Hattendorf *et al.*, 1977); en estos estudios se habla de que el **D⁹-THC** reduce considerablemente la actividad motora de las ratas, en el rango de dosis de 0.5-4 mg/kg. Pero hasta la fecha no se conocen estudios a fondo acerca de su efecto a nivel del músculo esquelético y menos aún los mecanismos de acción fisiológicos que de estos depende, mucho se ha mencionado que la Marihuana ayuda a relajar los músculos, pero no se ha encontrado el lugar ni los receptores sobre los que actúa.

En varios estudios se ha empleado el **D⁹-THC**, utilizando como vehículo de administración diferentes sustancias, como es el caso del etanol (Takahashi, 1974; Potvin, 1972), el propilenglicol (Jackson *et al.*, 1976; Anderson *et al.*, 1974; Bhargava *et al.*, 1995), y el éter de petróleo (Segura, 1972), los cuales se observó que no interfirieron con la actividad característica de este principio activo.

En el presente trabajo se estudian los efectos de este principio activo sobre la contracción del músculo esquelético, para que con los resultados que se obtengan se puedan establecer preliminarmente algunos posibles mecanismos de acción, dentro de la fisiología muscular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción del principio activo Δ^9 -THC. Una muestra de 30 gr de *Cannabis sativa* fue disuelta en 200 ml de etanol (1 gr de planta contiene aproximadamente 5 mg de Δ^9 -THC (Bowman, 1984)), esta muestra se mezcló y calentó en una parrilla a una temperatura de no más de 40°C; después se dejó evaporar el etanol, hasta obtener un extracto sólido, del cual se tomaron 6.6 mg para ser disueltos en 30 ml de propilenglicol como vehículo de administración, para así obtener una concentración de 1.1 mg/ml de Δ^9 -THC. La solución fue refrigerada en la oscuridad mientras no era utilizada. Las dos dosis de la solución de Δ^9 -THC (4 y 0.5 mg/kg), se calcularon de acuerdo al peso exacto de cada rata y fueron administradas vía intraperitoneal, de igual forma para los grupos con Propilenglicol.

Ratas. Se emplearon trece machos jóvenes de una cepa de ratas Wistar, que fueron proporcionadas por el Bioterio General de la E.N.E.P. Iztacala, las cuales poseían un rango de peso de 200-300 gr, y fueron alimentadas normalmente durante todo el tiempo de experimentación. Se formaron cinco grupos: dos grupos experimentales con tratamiento de solución de Δ^9 -THC, uno con dosis alta (A) de 4 mg/kg, y otro con dosis baja (B) de 0.5 mg/kg; otros dos grupos experimentales con tratamientos de Propilenglicol puro (para verificar si existía interacción entre el vehículo y el principio activo): uno en dosis alta (A) y otro en dosis baja (B), utilizando el mismo volumen del vehículo que el utilizado en los tratamientos de Δ^9 -THC respectivamente; y finalmente un grupo Control al cual no se le aplicó ningún tratamiento (ver Tabla 1).

Tabla 1.- Diseño Experimental.

	Grupo	No. de Ratas	Tratamiento
1	Δ^9 -THC _A	3	4 mg/kg. Δ^9 -THC
2	Δ^9 -THC _B	3	0.5 mg/kg. Δ^9 -THC
3	Propilenglicol _A	3	Dosis alta del vehículo
4	Propilenglicol _B	2	Dosis baja del vehículo
5	Control	2	Ninguno

Aparatos. Para el registro de la contracción muscular se utilizó un Fisiógrafo DMP-4B (Narco Bio-Systems Inc.), con un Miógrafo F-60, que se conectó a un acoplador transductor, con el cual se ajustó un rango de sensibilidad de 100-500 mV/cm. El registro se hizo en papel milimétrico a una velocidad de papel de 0.05 cm/seg.

Procedimiento. Cada rata era extraída del Bioterio minutos antes del experimento, y en todos los casos se anestesió con Pentobarbital Sódico (0.6 ml/kg) por vía subcutánea, para mantener el efecto de la anestesia, se le hacía respirar éter con ayuda de un algodón. Una vez dormida la rata, se le sujetaba a una tabla de disección, y se hacía un corte en alguna de las patas traseras, buscando aislar el nervio Ciático con ayuda de unas agujas de vidrio (para no despolarizarlo) y un hilo de nylon, después se separaba la porción distal del músculo Gastrocnemio cortando el tendón de Aquiles, para montarlo con ayuda de un hilo de nylon en el Miógrafo. A partir de aquí se comenzaba a perfundir con solución Ringer para mamífero, aproximadamente 1 ml cada 5 minutos, durante todo el experimento. Después se hacía una curva patrón a la sensibilidad correspondiente: con ayuda del Miógrafo se registraban dos fuerzas, una de 0.5 y otra de 5 gr respectivamente, estas dos formarían una pendiente de interpolación de gr vs. mm. Una vez hecho esto, con ayuda de unos electrodos conectados a un estimulador eléctrico de corriente directa, se estimulaba eléctricamente el nervio en un rango de voltaje bifásico de 0.1-1 V, aumentando 0.1 V a la vez en estímulos sencillos (esto es para no dañar al nervio por motivo de altas descargas eléctricas), se registraban los diferentes umbrales de contracción y se escogía el que tuviera el pico más alto, para que en ese voltaje se siguiera estimulando por el resto del experimento. Después se realizaba un registro de la tetanización del músculo (para comprobar el buen funcionamiento de este), en el cual se estimulaba continuamente por lapsos de 5 segundos con el voltaje antes establecido, y se dejaba descansar de 10-15 segundos aproximadamente entre cada estímulo; en cada una de las estimulaciónes se le incrementaba la frecuencia (en Hertz) del estímulo en el siguiente orden: primeramente a razón de 0.1 Hz, comenzando en 0.2 y aumentando hasta 2.5, a partir de ahí se incrementaba a razón de 1 Hz, comenzando en 3 y aumentando hasta 10, y después se incrementaba a

razón de 10 Hz, comenzando en 20 y aumentando hasta 60. Al final se corría un registro constante de fatiga muscular, a una frecuencia de estimulación de 0.6 Hz y con el voltaje establecido anteriormente; en este se registraba el comportamiento de la contracción muscular, durante un periodo de tiempo de 40 a 60 minutos. Después de identificar un comportamiento estable del músculo sin tratamiento por más de 10 minutos, se comenzaba a aplicar a la rata el tratamiento correspondiente de *D⁹-THC* ó Propilenglicol. Para hacer más evidentes los efectos de los tratamientos, se aplicaron hasta tres inyecciones por rata, con un lapso de tiempo aproximado de 15 minutos entre cada inyección. Al final del experimento se sacrificaba a la rata mediante una sobredosis de éter.

Análisis Estadístico. Los registros de fatiga muscular fueron analizados de la siguiente manera: se hizo un promedio por cada uno de los grupos experimentales de las tensiones ejercidas (gr), durante todo el registro (seg), y a estos promedios se les aplicó el método de mínimos cuadrados (con ayuda del programa Microsoft Excel 5.0) para ajustar una recta a cada grupo (ya fuera lineal o exponencial), se utilizaron las pendientes obtenidas de cada grupo, para compararlas con la pendiente del grupo Control (la cual fue calculada de igual manera que las anteriores), mediante la prueba de "t" de Student (con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$), para determinar si existían diferencias significativas entre las pendientes.

RESULTADOS

Los resultados de las pendientes y los valores de "t" de cada grupo experimental y del grupo Control, se presentan a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 2.- Resultados.

	<i>D⁹-THC_A</i>	<i>D⁹-THC_B</i>	Propilenglicol _A	Propilenglicol _B	Control
Pendiente	4.41244×10^{-4}	1.6723361×10^{-2}	-6.86701×10^{-4}	1.394607×10^{-3}	-1.27241×10^{-4}
Valor de "t"	51.8855	18.4077	-4.9671	4.5509	

El grupo Control presento una disminución exponencial (Fig. 1) de la respuesta del músculo, en la que cerca del final se observo un aumento de la respuesta, debido a la tetanización del músculo, y después una rápida caída de la respuesta, debido a la fatiga muscular normal.

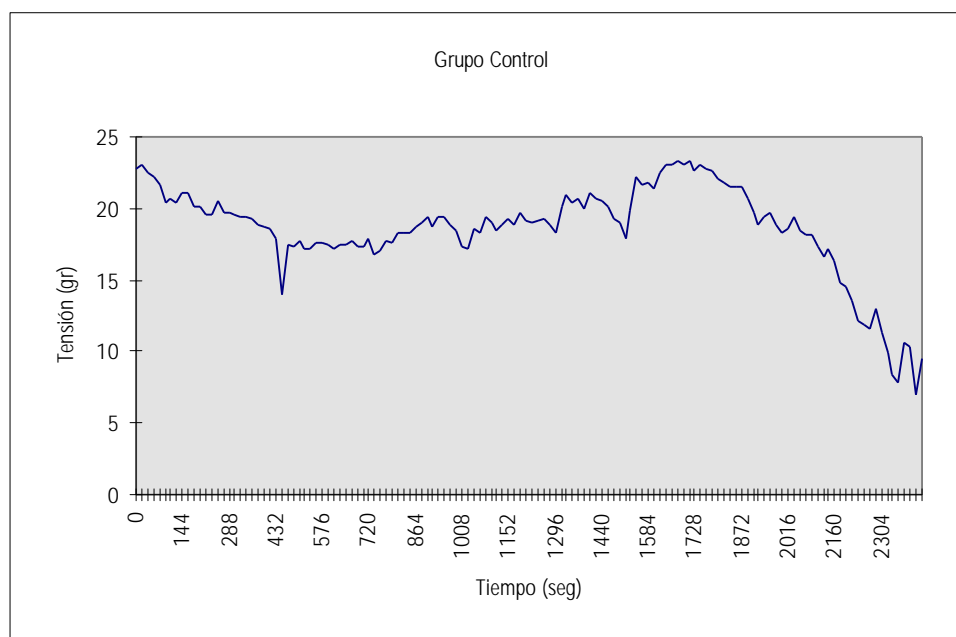


Figura 1. Comportamiento exponencial normal de la respuesta del músculo Gastrocnemio de la rata.

D⁹-THC. En el grupo con dosis alta (4 mg/kg), se presento un incremento exponencial (Fig. 2) de la respuesta del músculo (gr), el cual resultado significativo con respecto al grupo Control. En cuanto al grupo con dosis baja (0.5 mg/kg),

se presentó un incremento lineal (Fig. 3) de la respuesta del músculo, el cual también resultó significativo con respecto al grupo Control, aunque su pendiente fue mucho menor que la presentada en el grupo con dosis alta.

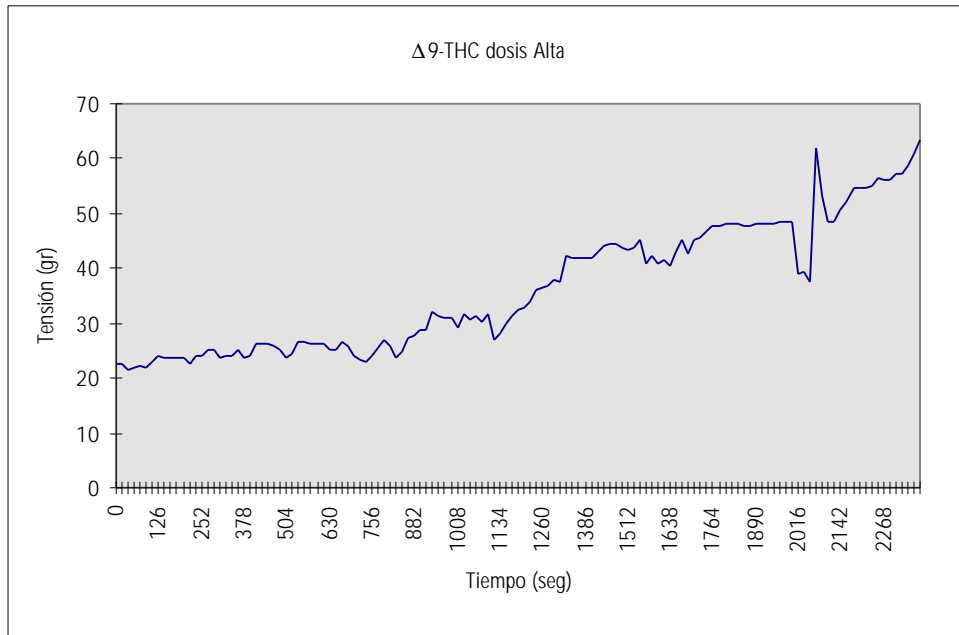


Figura 2. Comportamiento exponencial de la respuesta del músculo Gastrocnemio de la rata, con una dosis alta (4 mg/kg) de Δ^9 -THC.

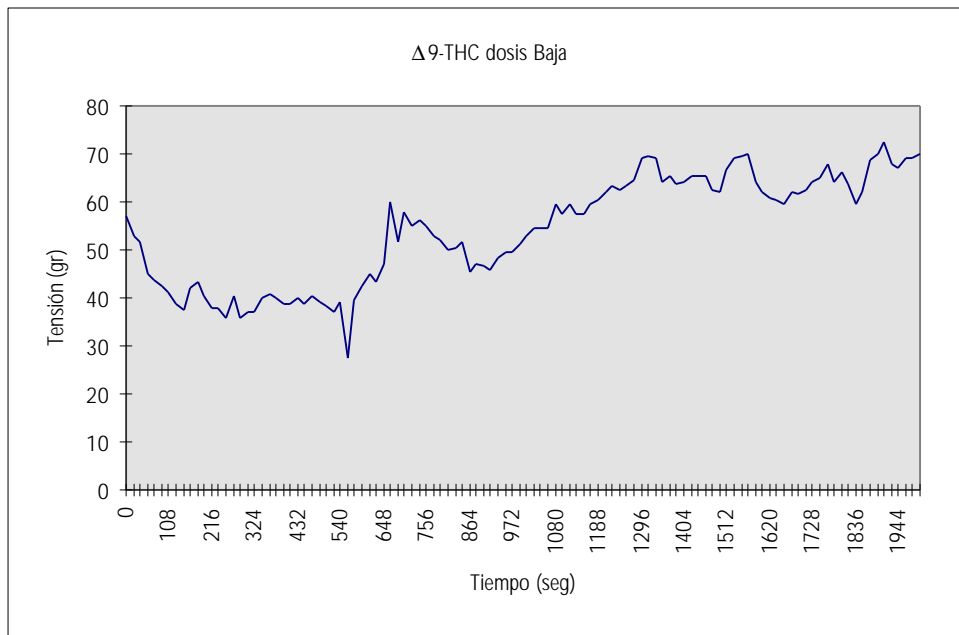


Figura 3. Comportamiento lineal de la respuesta del músculo Gastrocnemio de la rata, con una dosis baja (0.5 mg/kg) de Δ^9 -THC.

Propilenglicol. En el grupo con dosis alta, se presentó una disminución lineal (Fig. 4) de la respuesta del músculo (gr), la cual resultó significativa con respecto al grupo Control a pesar de ser muy semejante; esta pendiente fue menor que la presentada en los grupos con Δ^9 -THC. En cuanto al grupo con dosis baja, se presentó un incremento lineal (Fig. 5) de la respuesta del músculo, el cual no resultó significativo con respecto al grupo Control.

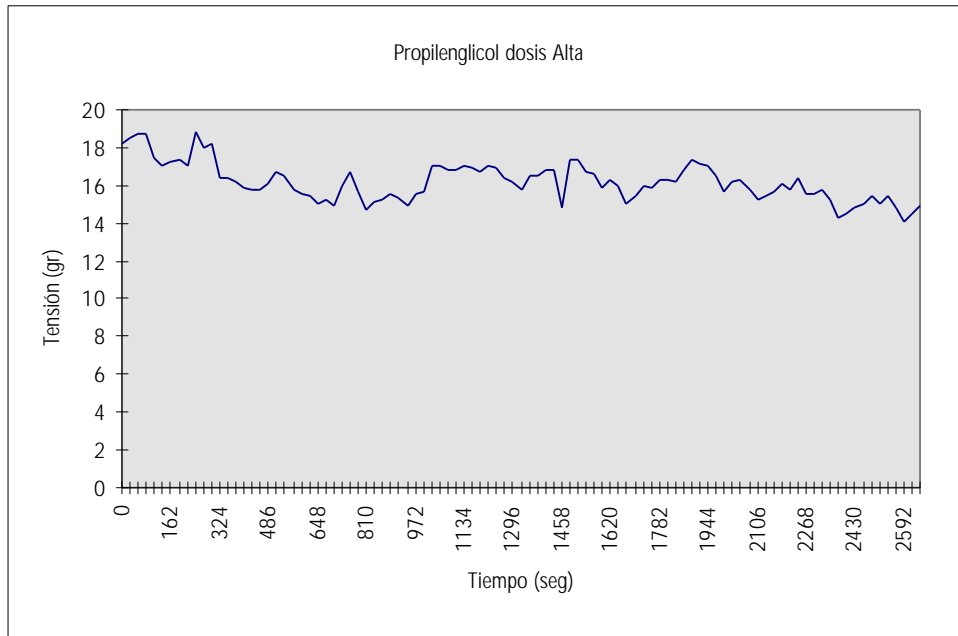


Figura 4. Comportamiento lineal de la respuesta del músculo Gastrocnemio de la rata, con una dosis alta de Propilenglicol.

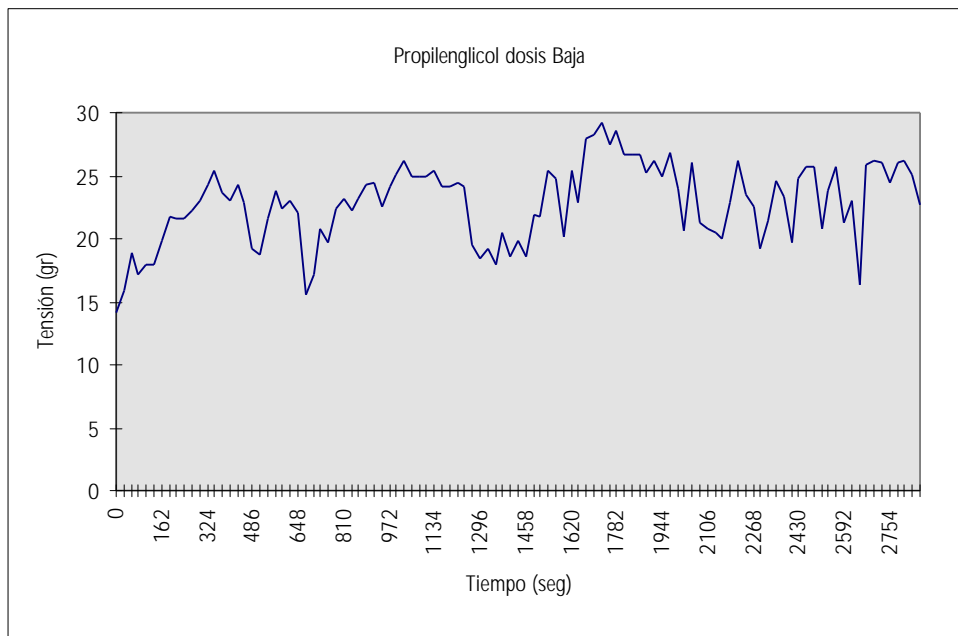


Figura 5. Comportamiento lineal de la respuesta del músculo Gastrocnemio de la rata, con una dosis baja de Propilenglicol.

DISCUSIÓN

Después de realizar este estudio, podemos definir el comportamiento característico de la fatiga muscular de la siguiente manera: después de un trabajo constante y sin interrupción se músculo, se sobreviene una tetanización, esta se mantiene por un periodo de tiempo y después sobreviene una caída en la respuesta de contracción.

En base a esto y a los datos obtenidos en los grupos experimentales, podemos interpretar algunos de los efectos producidos por el *D⁹-THC*: en dosis altas (4 mg/kg) se produce un aumento de la respuesta de contracción del músculo, el cual se ve potenciado de forma exponencial, debido al efecto aditivo que tiene el Propilenglicol en una alta concentración; y en cuanto a las dosis bajas (0.5 mg/kg) se produce un aumento de la respuesta de contracción del

músculo, con una tendencia lineal, y en el cual no se muestra una potenciación producida por el vehículo, debido a la baja concentración de este.

Podemos deducir que cuando se presentan los efectos de una alta o baja concentración de **D⁹-THC** en el organismo, el músculo esquelético puede desarrollar fuerzas mayores, aun cuando el trabajo muscular a desarrollar sea mínimo; es decir, que si para realizar un trabajo determinado se necesita liberar una cantidad específica del neurotransmisor Acetilcolina (ACh), bajo los efectos del **D⁹-THC**, se liberaría mayor cantidad del neurotransmisor para realizar el mismo trabajo (lo cual produciría una mayor despolarización en la membrana post-sináptica, y por lo tanto una contracción más fuerte); esto podría explicarse de 2 maneras según nuestro punto de vista: el **D⁹-THC** de alguna forma provoca una mayor liberación de neurotransmisor en la placa motora, lo cual produce una mayor despolarización de la membrana tal como se había citado anteriormente; ó que de alguna forma provoca una mayor sensibilidad en los canales de ACh, lo cual indicaría que no importa el trabajo muscular a desarrollar, se liberaría una concentración normal de neurotransmisor, y se produciría una gran despolarización, pero debido a que los canales de ACh son demasiado sensibles, aun a las bajas concentraciones de este neurotransmisor.

Sería aventurado concluir esto, ya que nuestra metodología experimental puede en algún momento estar mal estructurada, ya que en otros estudios, se ha administrado el **D⁹-THC** por lo menos 1 hora antes de la experimentación, como es el caso del estudio realizado por Hattendorf *et al.* (1977), en el que se atribuye el efecto del **D⁹-THC** a nivel del tallo cerebral, por lo cual se tenía que esperar un lapso de tiempo para que se presentaran los efectos, y después se hacían las evaluaciones correspondientes.

En su momento, nosotros juzgamos que el diseño experimental era el más adecuado, debido tal vez a la carencia de bibliografía sobre estudios de este tipo a nivel del músculo esquelético. Estamos conscientes, de que sería más representativo el haberlo elaborado con un número mayor de ratas por grupo, ya que la gran diversidad de factores (peso, edad, alimentación, anestesia, éter), que en algún momento pueden introducir ruido en los resultados, son objeto de estandarización cuidadosa. Claros ejemplos son: el uso de Pentobarbital Sódico, el cual está comprobado que tiene un margen de seguridad muy pequeño; y la posible desmielinización del nervio Ciático, debido a su aislamiento y manipulación constante.

Por lo pronto podemos sugerir una nueva metodología experimental, utilizando el mismo diseño para los grupos, que solo tendría ligeros cambios con respecto a la realizada: se anestesiaría con Tiopental Sódico (o alguna anestesia que no tenga mucha interferencia sobre el sistema nervioso), los tratamientos con **D⁹-THC** se aplicarían con una sola inyección por rata, y sería con una hora de anticipación a la disección, para que de esta forma se pudieran comprobar sus efectos a nivel de sistema nervioso central, y de esta manera hacer una interpretación más adecuada en cuanto a lo que podría estar o no sucediendo en la terminal nerviosa o en la placa motora.

Como dato interesante podemos agregar: cuando se hacía el aislamiento del nervio Ciático, después de cortarlo, las ratas presentaban una joroba muy pronunciada (debida tal vez a la despolarización que produce el dañar un nervio de esta forma), y al aplicar cualquiera de los tratamientos de **D⁹-THC**, esta joroba desaparecía por completo, lo cual no sucedía en los grupos con propilenglicol, ni en el grupo Control; esto nos muestra una gran contradicción, ya que al mismo momento que el músculo Gastrocnemio desarrollaba fuerzas inmensas, los músculos de la espalda se relajaban para adoptar una posición flácida.

CONCLUSIONES

Una vez finalizado el experimento podemos concluir los siguientes puntos:

1.- El efecto producido por el **D⁹-THC** en el rango de dosis de 0.5-4 mg/kg, sobre la contracción muscular se caracteriza por: un aumento en la respuesta motora del músculo y una ausencia de fatiga muscular mientras permanecía el efecto. Este aumento es relativo a la dosis administrada.

2.- El efecto de interacción del Propilenglicol como vehículo de administración del **D⁹-THC**, solo es significativo en altas concentraciones de este vehículo.

3.- Aparte del sistema nervioso central, la respuesta producida por el **D⁹-THC** en la contracción muscular, también podría tener lugar dentro de la placa motora.

RECONOCIMIENTOS

Nos gustaría agradecer al Dr. Teodoro Villanueva por su colaboración al inicio del experimento, así como al Laboratorio de Fitoquímica de la UBIPRO por las facilidades otorgadas para la elaboración del extracto, y en especial al Biol. Vicente Sandoval Herrera por su participación y apoyo en este estudio.

REFERENCIAS

- ANDERSON, P., *et al.* 1974. *Tolerance to the Effects of D⁹-Tetrahydrocannabinol in Mice on Intestinal Motility, Temperature and Locomotor Activity.* Psychopharmacologia. 43, 31-36.
- BHARGAVA, H., *et al.* 1995. *Cellular Immune Function in Mice Tolerant to or Abstinent from l-trans-D⁹-tetrahydrocannabinol.* Pharmacology. 52, 271-282.
- BOWMAN, W., y Rand, M. 1984. *Farmacología Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones Clínicas.* 2ª Edición. Nueva Editorial Interamericana. México D.F.
- CARR, C., *et al.* 1971. *Marihuana.* 2ª Edición. Editorial Monte Ávila. Venezuela.
- CLARK, W. 1991. *Farmacología Clínica.* 1ª Reimpresión. Edit. Medica Panamericana. México D.F.
- DE LA GARZA, F. 1987. *La juventud y las drogas.* Editorial Trillas. México D.F.
- DIPALMA, J. 1980. *Farmacología Básica y Terapéutica Médica.* 1ª Edición. Editorial La Prensa Medica mexicana. México D.F.
- ECKERT, R. 1990. *Fisiología Animal. Mecanismos y Adaptaciones.* 3ª Edición. McGraw Hill Interamericana. Madrid, España.
- GRINSPOON, L. 1973. *Reconsideración de la Marihuana.* 1ª Edición. Editorial Extemporáneos. México, D.F.
- GRINSPOON, L., y BAKALAR, J. 1995. *Marihuana as Medicine. A plea for Reconsideration.* Journal of the American Medical Association. <http://turnpike.net/~jnr/grinjama.htm>
- GUYTON, A., y HALL, J. 1997. *Tratado de Fisiología Médica.* 9ª Edición. McGraw Hill Interamericana. México, D.F.
- HATTENDORF, CH., *et al.* 1977. *Interaction between D⁹-Tetrahydrocannabinol and d-Amphetamine.* Psychopharmacology. 54, 177-182.
- HAVARD, M. 1992. *Fármacos en la Enfermería.* 2ª Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F.
- HOCHMAN, J. 1975. *Marihuana y Evolución Social.* Editorial Diana. México, D.F.
- JACKSON, D., *et al.* 1976. *The Interaction between Prostaglandin E₁ and D⁹-Tetrahydrocannabinol on Intestinal Motility and on the Abdominal Constriction Response in the Mouse.* Psychopharmacology. 47, 187-193.
- KATZUNG, G. 1986. *Farmacología Básica y Clínica.* 2ª Edición. Edit. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F.
- MECHOULAM, R., y BICHER, H. 1968. *Pharmacological effects of two active constituents of Marihuana.* Arch. Int. Pharmacodyn. 172, 24-3.
- POTVIN, R., y FRIED, P. 1972. *Acute and Chronic Effects on Rats of (-) D⁹-trans-Tetrahydrocannabinol on Unlearned Motor Tasks.* Psychopharmacologia. 26, 369-378.
- SEGURA, J. 1972. *Marihuana.* 2ª Edición. AMIC Editor. México, D.F.
- SESÍN, S. 1998. *El hilo verde entre las culturas.* Periódico Uno más Uno. Suplemento Cultural. Página 4.
- SKIDMORE, E. 1996. *Cannabidiol: The Wonder Drug of the 21st. Century?* <http://www.calyx.com/~olsen/medical/cbd.html>
- TAKAHASHI, R., y KARNIOL, I. 1974. *Pharmacological Interaction between Cannabinol and D⁹-Tetrahydrocannabinol.* Psychopharmacologia. 41, 277-284.
- ULF, H. 1972. *La Marihuana.* Monte Ávila Editores. Caracas, Venezuela.