

# Acción del L. S. D. en cultivos de sangre normal

por

SANTIAGO DIEZ GARCIA

Premio: «Lepetit»

## SUMMARY

For further more information to the intensive bibliography written in this work, we present our values of the influence of LSD on blood culture prepared in order to obtain cariotypes. According to Hunger-Ford and Markowitz's Works, variations are outstanding and the results I got are relative to citomorphology, they appear on the corresponding microphotos, with a minimum dosis of 0,10 mcg. of LSD per 8 c. c. of leucocytes culture. The effects are meaningful, very different blastos and macrophagos cells appear and of a bigger size to the ones which are in normal cultures.

Though, if in the indicated dosis we can observe a great quantity of mitosis, they are all abnormal. It has been impossible to obtain a cariotype. A great quantity of gats and cromatics fragments appear.

## I. PARTE TEÓRICA

### I.1. *Farmacología del L S D*

Con el nombre de drogas alucinógenas psicotomiméticas o psicodélicas se designan aquellas sustancias que producen alteraciones mentales emocionales y del comportamiento, semejantes a las que se manifiestan en las psicosis, con desorganización de la personalidad, y que se acompañan de alucinaciones (falsas impresiones sensoriales). Se trata de drogas psicotrópicas, es decir, perturbadores psíquicos y que revisten sumo interés, pues son capaces de provocar psicosis experimentales o psicosis modelo, que luego pueden servir de base para el estudio de la acción de diferentes fármacos; en cambio, las drogas psicotomiméticas no han recibido hasta el presente una amplia aplicación terapéutica como tales. Las principales son derivados del indol y análogos.

Como todos sabemos, los efectos de estos grupos de drogas consisten en afectar al funcionamiento del sistema nervioso central.

En cuanto a la clasificación de los psicofármacos, hasta hoy día no existe una totalmente aceptada, si bien hay diversas clasificaciones

recomendadas, unas de tipo individual: Delay (7, 8), Change (5), Kline (12); otras por asociaciones de tipo internacional, tales como la Organización Mundial de la Salud (27), o la Asociación Médica Americana (1).

El orden más lógico me parece ser el de Jean Delay, que agrupa los psicofármacos en tres categorías, siguiendo su modo de acción sobre la actividad mental:

1. *Los psicoelépticos* o psicoinhibidores que deprimen la actividad mental produciendo una disminución del funcionamiento intelectual o provocando una sedación de la tensión emocional.

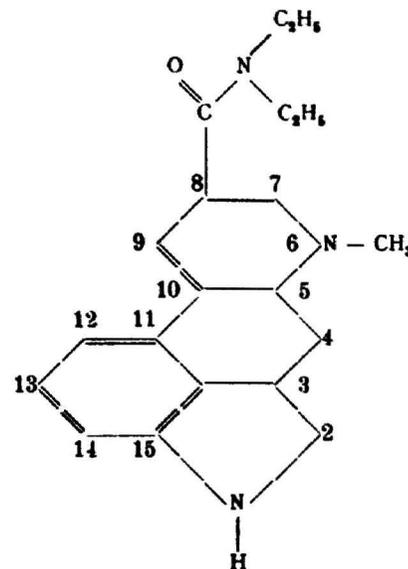
2. *Los psicoanalépticos*, que tienen por efecto estimular la actividad mental por procesos que varían según su constitución química.

3. *Los psicodislépticos*, que alteran la actividad mental provocando estados psicológicos anormales y distorsiones en la percepción de la realidad.

Cada uno de estos grupos abarcan otros subgrupos:

- |  |  |   |
|--|--|---|
| A) Psicoelépticos                        | 1) Hipnóticos o sedativos  | a) Barbitúricos                           |
|  |  | b) No barbitúricos                        |
|  |  |   |
| 2) Neurolépticos                         | a) Grupo dimetílico  |   |
|  | b) Grupo de la piperacina  |   |
|  | c) Grupo de la piperidina  |   |
| 3) Tranquilizantes                       | Mayores  |   |
|  | Menores  |   |
| B) Psicoanalépticos o psico-estimulantes | 1) Estimulantes de acción directa sobre el S. N. C.  | a) Cafeína                                |
|  |  | b) Aminas simpaticomiméticas              |
|  |  | c) Aminas heterocíclicas                  |
|  | 2) Estimulantes de acción indirecta sobre el S. N. C.  | a) Hidracinas, inhibidores de la M. A. O. |
|  |  | b) No-hidracinas                          |
|  | 3) Agentes timolépticos cuya acción principal es de hacer desaparecer los síntomas depresivos sin estimular necesariamente el S. N. C. |   |
|  | C) Psico-dislépticos o alucinógenos  | a) LSD y derivados                        |
|  |  | b) Mescalina                              |

El L. S. D. es el dietilamida del ácido lisérgico y por tanto, es derivado del indol. Responde a la siguiente fórmula química:



En los animales, como el perro y el gato, las dosis empleadas varían mucho de unos trabajos a otros. En el hombre, el L. S. D. es una de las drogas más poderosas de la farmacología, pues actúa a dosis de 30 a 100 mcg.

### I.2. Cultivos sanguíneos

Tras su comunicación inicial, Cohen, Hirschor y Frosh (3, 4) añaden a su protocolo experimental los estudios llevados a cabo en veintidós individuos, los cuales habían ingerido LSD o estuvieron expuestos a la misma durante su vida intrauterina, encontrando en sus cromosomas anomalías, en número que excedía al considerado lógico, en pacientes estimados como testigos, ya que no eran usuarios de drogas. En los individuos estudiados se daba el caso de haber consumido además del LSD otros fármacos, entre ellos, la clorpromacina.

Diversas comunicaciones señalan un incremento en las anomalías de los cromosomas de los leucocitos en usuarios del LSD, en comparación con individuos-control, apreciando igualmente roturas

en los cromosomas de niños cuando sus madres estuvieron expuestas a la droga, sin llegar a deducir correlación exacta entre el daño observado, la dosis y la frecuencia del uso.

Maimon y colaboradores (16), de la Universidad del Estado de Nueva York, asocian al LSD un aumento de roturas cromosomales, en 40 usuarios de la droga, en Búffalo, afectando aquéllas a cuatro chicos durante su vida en el seno materno, incidencia nociva citada también por el doctor Kurt Hirschorn, del Mount Sinai Medical College (29), el cual presentó su estudio en una conferencia de Dartmouth Medical School, en Hannover, NH (Estados Unidos), con resultados de experiencias *in vitro* e *in vivo*, considerando como uno de los efectos nocivos del LSD la supresión de la mitosis.

Los estudios *in vitro* señalan que el daño ocasionado, por una proporción indeterminada, en los cromosomas afectados, puede manifestarse por pérdidas fetales, malformaciones congénitas, retraso mental, posibles neoplasmas, etc., siendo de esta opinión los doctores Nielsen, Friedrich y Tsuboi (19).

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas de aberraciones cromosomáticas, antes de la toma, ni después de ingerir LSD. Los investigadores de Baltimore deducen de su estudio que no había evidencia significativa de que el fármaco puro daña los cromosomas de los leucocitos humanos *in vivo*, como en cultivos *in vitro* de setenta y dos horas.

Markowitz y Klotz, de la Universidad de Wisconsin (17), usando métodos estadísticos, contrastan los estudios de Tijio y cols. (30), llegando a manifestar que el LSD tiene una acción significativa lesiva en los cromosomas humanos después del tratamiento con LSD.

En idéntico sentido a Tijio se pronuncian Berder y Sankar (2), los cuales no encuentran lesiones cromosomáticas en los leucocitos de un niño tratado con LSD, opinión compartida por Sparkes, Melnyk y Bozzetti (25).

### 1.3. Objeto del trabajo

Es inmensa la bibliografía encontrada, sobre todo a partir de los últimos diez años, y muy discordantes los resultados obtenidos hasta ahora, sobre la acción del LSD, tanto *in vivo* como *in vitro*.

No he observado en la bibliografía consultada la citología que se presenta por efectos de la droga indicada, sí he podido observar en todos los trabajos los efectos, sobre el sistema nervioso central, y, sobre el cariotipo, tanto de personas sanas como de enfermos de diversa etiología, etc.

Me propongo con el presente trabajo realizar un estudio citomor-

fológico, derivado de la acción del LSD en cultivos sanguíneos procedentes de sangre de personas sanas con el objeto de comprobar la acción y transformación que puedan sufrir las células en un medio de cultivo idóneo para las mismas, con adición de la droga, que a dosis no letales provoca cambios de consideración.

He utilizado la microscopía de fluorescencia para la observación celular, ya que esta técnica nos permite la diferenciación de estructuras con gran nitidez usando el fluorocromo adecuado.

## II. PARTE EXPERIMENTAL

### II.1. Materiales empleados

#### II.1.1.

Todo el material necesario para la obtención de cariotipos.

#### II.1.2. Microscopio de fluorescencia

II.1.2.1. Microscopio Carl-Zeiss automático.

II.1.2.2. Lámpara de vapor de mercurio.

La lámpara de mercurio HBO 200 W, de alta presión (391603), tiene una potencia absorbida de 200 W y una densidad de iluminación (brillantez) de unos 25.000 Stilb. Por lo que respecta a su eficacia en el espectro de onda corta y a la comodidad de manejo, puede considerarse como superior a la lámpara de arco voltaico.

II.1.2.3. *Filtro excitador*. El de microscopio citado anteriormente. Usamos el filtro excitador denominado por la casa BG 3/4 (4 m. m. de espesor). Este filtro tiene un flanco más pendiente hacia las ondas largas, así como una transmisión mayor en el ultravioleta.

Intervalo de transmisión aproximado: 270 hasta 480 m $\mu$ . Asimismo, presenta notables transmisiones en el rojo, por encima de 600 m $\mu$  y en el infrarrojo.

II.1.2.4. *Filtros de supresión*. Estos filtros, que absorben la luz de excitación de onda corta, dejando pasar únicamente la de onda más larga de la imagen de fluorescencia, se colocan entre la preparación y el ojo del observador. El filtro usado por nosotros es el que la casa posee con el núm. 41, que tiene un grado de transmisión de 0,01, o sea, el 10 por 100 de la radiación incidente es transmitida para una longitud de onda de unos 410 milimicras.

II.1.3. *Microfotografía*

## II.1.3.1. Cámara fotográfica:

La que tiene acoplada el microscopio.

## II.1.3.2. Película fotográfica:

Película Ilford FP4 de 125 ASA, 22 DIN para blanco y negro.  
Película Kodacolor-X CX 135 de 85 ASA, 20 DIN para color.  
Película fujicolor N 100 de 100 ASA, 21 DIN.

## II.1.3.3. Tinción con Wright:

Solución Tampón.  
Colorante Wright.

## II.1.3.4. Tinción con May-Grumwald-Giemsa:

Solución de May-Grumwald.  
Solución de Giemsa.  
Agua destilada neutra.

II.2. *Métodos utilizados*II.2.1. *Preparación de los medios*

Lavado y esterilización. El material que interviene en estas técnicas de cultivos, como tubos, tapones de goma, etc., debe estar cuidadosamente limpio y además estéril. El tiempo que se «pierde» en la escrupulosa limpieza del material se gana con creces al evitar fallos masivos en los cultivos. Primeramente las jeringas, agujas, pipetas de Pasteur, filtro estéril, tubo de cultivo, tapones de goma virgen, erlenmeyer y pipetas, los lavamos a fondo con detergente en polvo, aclarándolos bien.

Cada semana todo el material prelavado en el paso anterior, lo hervimos en agua y detergente en polvo durante diez minutos; dejamos enfriar un poco el agua del lavado y limpiamos, escrupulosamente con los limpiatubos, uno por uno cada unidad de material. Aclaremos abundantemente por dos veces con agua del grifo y pasamos el material a un cristizador con agua destilada. Lo sacamos ayudándonos de unas pinzas y los colocamos a secar sobre un papel de filtro, en una zona del laboratorio libre de polvo.

Una vez secos envolvemos cada unidad en papel manila, para asegurar la continuidad de la esterilización, y esterilizamos por calor seco a 160° durante dos horas.

El material para el filtrado de los medios de cultivo, como es el filtro, tapones de goma, agua destilada utilizada, lo esterilizamos por calor húmedo a una atmósfera de presión durante veinte minutos en autoclave.

El medio de cultivo utilizado por nosotros ha sido el T. C. 199, suministrado por la casa Difco; es un medio nutricio calculado por Morgan, Morton y Paker, para el cultivo de tejidos. Está formado por unos 60 componentes, la mayor parte aminoácidos y vitaminas, al cual se le adiciona solución equilibrada de Hanks, y Tween como aportador del ácido graso. Lleva incorporado rojo fenol. Nosotros le agregamos antibióticos para evitar el crecimiento de bacterias. Ajustamos su pH a 7,2-7,4, añadiendo bicarbonato sódico. El medio suministrado por la casa Difco es un polvo desecado, el cual se conserva en nevera y en desecador. Para preparar la solución del medio de cultivo lo hacemos de la siguiente forma.

T. C. 199 polvo ... ..	550 mg.
Bicarbonato sódico ... ..	16 »
Estreptomina en polvo ... ..	6 »
Penicilina en polvo ... ..	5 »
Agua destilada C. S. P. ... ..	50 c. c.

Una vez disueltos los componentes, le esterilizamos por filtración, y lo conservamos en erlenmeyer estéril en el congelador de frigorífico, donde se conserva hasta seis meses, siempre y cuando se mantega congelado.

II.2.2. *Técnica de observación de preparaciones*II.2.2.1. *Recién extraída la sangre.*

Una vez recogida la muestra y hecho el frotis hemos realizado las tinciones por May-Grumwald-Giemsa, Wright, Negro Sudán, fosfatasas, peroxidadas y demostración de la presencia de DNA y RNA.

La demostración del DNA y RNA se lleva a cabo mediante la tinción y su observación inmediata por microscopía de fluorescencia, el DNA toma color amarillo verdoso y el RNA un color rojo.

II.2.2.2. *A las veinticuatro, cuarenta y ocho y setenta y dos horas.*

Se observan los frotis y las preparaciones en fresco (estas últimas previa tinción con anaranjado de acridina). Tanto unas como otras son observadas muy detenidamente, fijándonos en aquellas células y aquellos campos microscópicos, en los que aparecían diferencias morfológicas significativas, haciendo las microfotografías de estos campos.

Una vez pasadas las setenta y dos horas de cultivo, se echa la solución de colchicina y se deja actuar durante cuarenta y cinco minutos, después de los cuales se pasan los medios con las células a tubos de centrífuga y se someten a 1.000 r. p. m. durante cinco minutos, al cabo de los cuales se tira el sobrenadante, dejando solamente 1 cc. A las células que forman el sedimento se le añaden 5 cc. de agua destilada, se agita la suspensión y se deja estar sobre una gradilla durante treinta minutos.

Después de este choque hipotónico centrifugamos a 1.000 r. p. m. durante cinco minutos, tiramos el sobrenadante hasta dejar 1 cc. A continuación añadimos el fijador Carnoy, recientemente preparado de la forma siguiente:

Alcohol metílico .....	3 partes
Acido acético .....	1 parte

Agitamos la suspensión celular en este fijador, centrifugamos a 1.000 r. p. m. durante cinco minutos, tiramos el sobrenadante dejando 1 cc. Al sedimento celular añadimos otros 5 cc. de nuevo fijador Carnoy, lo mezclamos y lo centrifugamos durante cinco minutos a 1.000 r. p. m. Tiramos el sobrenadante dejando 1 cc., en el cual hacemos la suspensión de las células del sedimento.

Una vez que tenemos los portas bien limpios, con una pipeta Pasteur vamos depositando en cada uno de ellos dos gotas de la suspensión celular, dejamos secar al aire y teñimos con solución Giemsa recientemente preparada, de la siguiente forma:

Agua destilada .....	1 c. c.
Solución Giemsa .....	2 c. c.

Al cabo de treinta minutos de estar los portas introducidos en la solución Giemsa anterior, se lavan con agua y se dejan al aire. Después los observamos al microscopio con objetivo de inmersión, fijándonos exclusivamente en las mitosis que aparecen y escogiendo para hacer microfotografías, las que aparecen con los cromosomas bien dispersos. De esta forma se puede observar fácilmente el número de cromosomas y la forma de cada uno, sobre todo en aquellas mitosis que aparecen con los cromosomas bien separados, como podemos observar en los cariotipos, que presentamos en el capítulo de resultados.

### II.2.2.3. Microfotografías:

Realizamos las preparaciones, bien por frotis, o mediante tinción con anaranjado de acridina, las observamos en el fotomicroscopio ya descrito.

Los frotis los observamos con el objetivo de 45 x para ver más amplitud de campo, y con el objetivo de inmersión para apreciar mejor la morfología celular. Enfocada la preparación convenientemente, hacemos las microfotografías, que realizamos nosotros, revelamos, ampliamos, etc., según los métodos habituales en nuestro laboratorio fotográfico, salvo los trabajos en color, que nos los ha realizado la casa Kodak.

De las preparaciones observadas por microscopía de fluorescencia, hicimos las microfotografías más significativas, con el microscopio y las películas fotográficas citadas anteriormente. Como fuente de radiación hemos utilizado la lámpara descrita de vapor de mercurio, montada en la caja de la lámpara de microscopía de alta potencia.

Usamos en la observación los filtros excitadores y supresores descritos, convenientes para obtener una buena imagen de microscopía de fluorescencia.

## III. RESULTADOS

Todos los resultados obtenidos son concordantes y se muestran en las microfotografías que a continuación se presentan.

Como test control presentamos cultivos con sangre normal, el test en estudio fue el de cultivos sanguíneos con la adición de LSD en la proporción ya indicada.

Los frotis fueron teñidos por la técnica de May-Grunwald-Giemsa. Hemos realizado también frotis teñidos con el fluorocromo citado en el capítulo anterior, y los hemos observado por microscopía de fluorescencia.

Casos estudiados: *ciento tres*.

Preparaciones realizadas: *mil diecisiete*.

Aumentos del microscopio para las microfotografías que presentamos: *mil cuatrocientos treinta*.

De todos los campos microscópicos y de todas las microfotografías obtenidas, presentamos solamente aquellas que, con los mismos resultados, presentan los efectos más patentes y son más significativas.

### III.1. Cultivos de sangre periférica normal

Por fluorotinción se observan linfocitos y plaquetas, tal y como se presentan en las microfotografías núms. 1 y 2. El color verde aparece como consecuencia del ADN, por tinción con el fluorocromo anaranjado de acridina.

El color rojo se debe a las plaquetas y restos celulares de otras células o también los neutrófilos, que desaparecen a medida que avanza el tiempo de cultivo.

En la microfotografía núm. 3 aparecen linfoblastos y plaquetas. Pequeñas condensaciones cromáticas en los linfoblastos y también nucleolos. Las plaquetas persisten durante todo el tiempo que dura el cultivo. También se observan restos de neutrófilos de color rojo, por la tinción del RNA con el fluorocromo.

En la microfotografía núm. 4 presentamos un cariotipo normal: es decir, mitosis, cariograma y el idiograma correspondiente.

### III.2. Cultivos de sangre periférica normal con LSD

La adición del LSD ha sido en todos los cultivos la misma proporción de 0,1 mcg en 8 cc. de cultivo.

En la microfotografía núm. 5, a las veinticuatro horas de cultivo, se aprecian gran cantidad de linfoblastos en interfase, mayor cantidad de heterocromatina y mayor nucleolo. El color verde corresponde al ADN, el color rojo del citoplasma es consecuencia de la existencia del RNA.

En la microfotografía núm. 6 observamos, por fluorotinción, gran actividad celular, grandes linfoblastos con gran cantidad de RNA en el citoplasma y en el nucleolo, siendo éste muy patente.

A las setenta y dos horas de cultivo continúan las células dividiéndose activamente. Aparecen muchos y grandes macrófagos, como se observa por fluorotinción en las microfotografías núms. 7 y 8.

En la tinción por Giemsa, tal como muestran las microfotografías números 9, 10, 11, 12, 13 y 14 aparecen muchas células en mitosis, también células atípicas, en profase o todo lo más en prometafase, gran cantidad de puntos heterocromáticos, dispersos por toda la célula, que indican una iniciación a la división incontrolada. Los cromosomas aparecen con gran cantidad de fragmentos y roturas, lo que no permite realizar el cariograma.

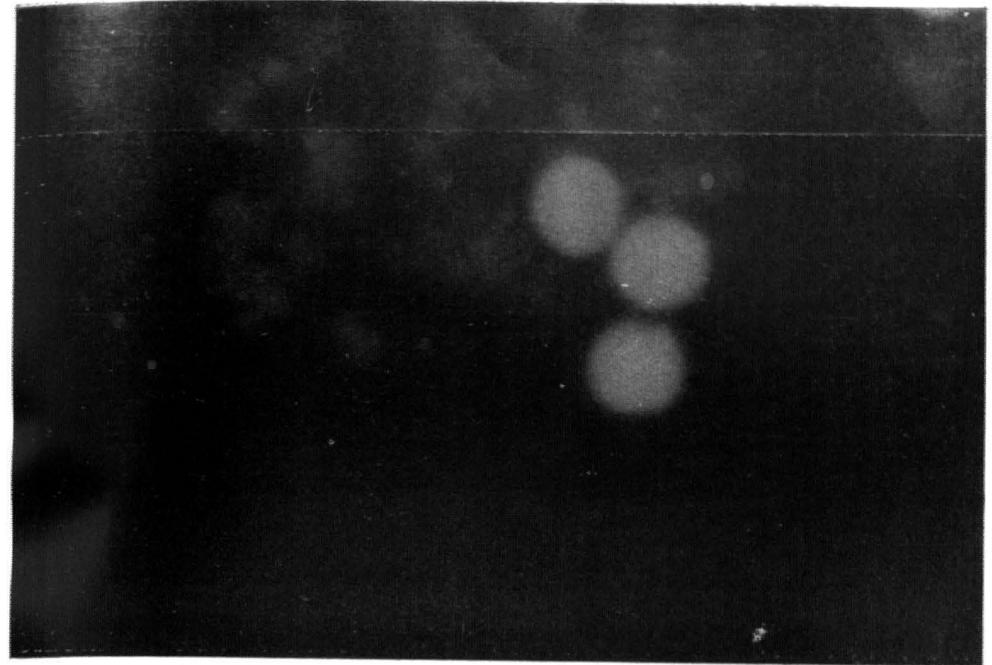
## IV. DISCUSIÓN

La literatura sobre alteraciones producidas en los cromosomas humanos, debidas al LSD, es extensa y contradictoria.

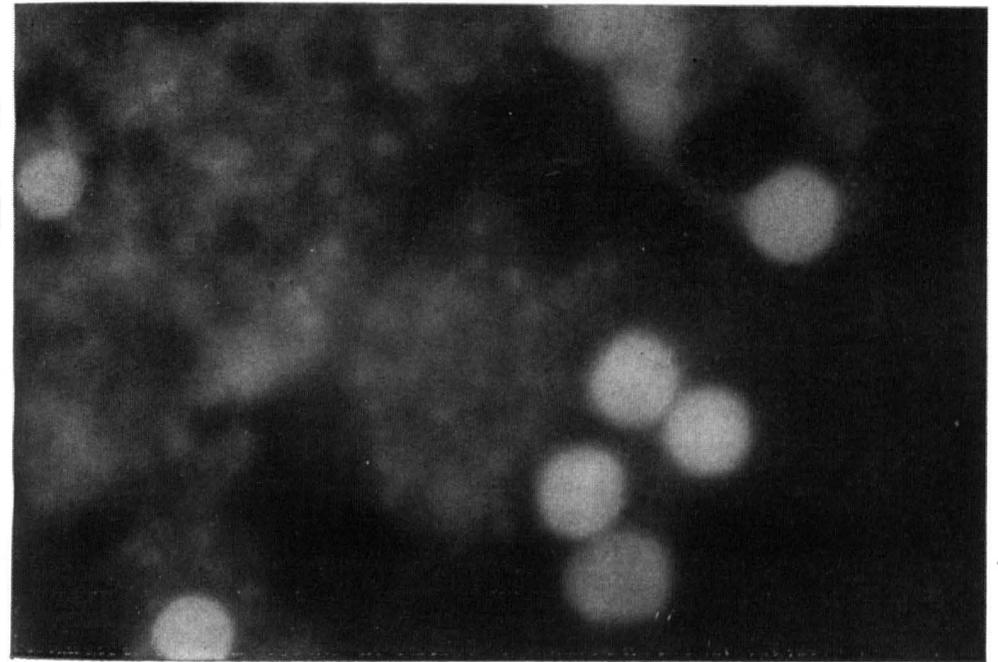
Los primeros autores, casi unánimemente, creían que el LSD daba lugar a anormalidades cromosómicas, Cohen y cols. (4); Egozcue, J. y cols. (8); Irwin y Egozcue (31); Nielsen y cols. (20).

Los últimos trabajos especulan sobre si se producen o no tales anormalidades *in vivo*. Long, Sally, Y. (14); Lucas y Wolfgang, L. (15); Rumke, L. (22); Stencher, M. A. y Jarvis, J. A. (26).

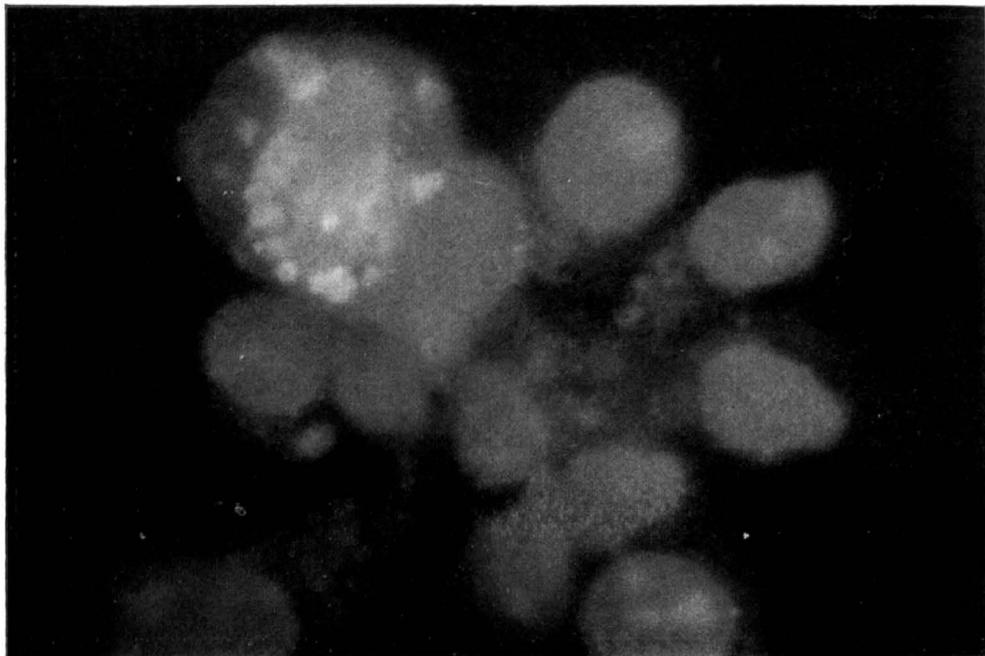
Nielsen y cols. encuentran aumento en la frecuencia de entrecruzamientos y roturas en los cromosomas de 17 enfermos mentales,



Microfotografía 1



Microfotografía 2



Microfotografía 3

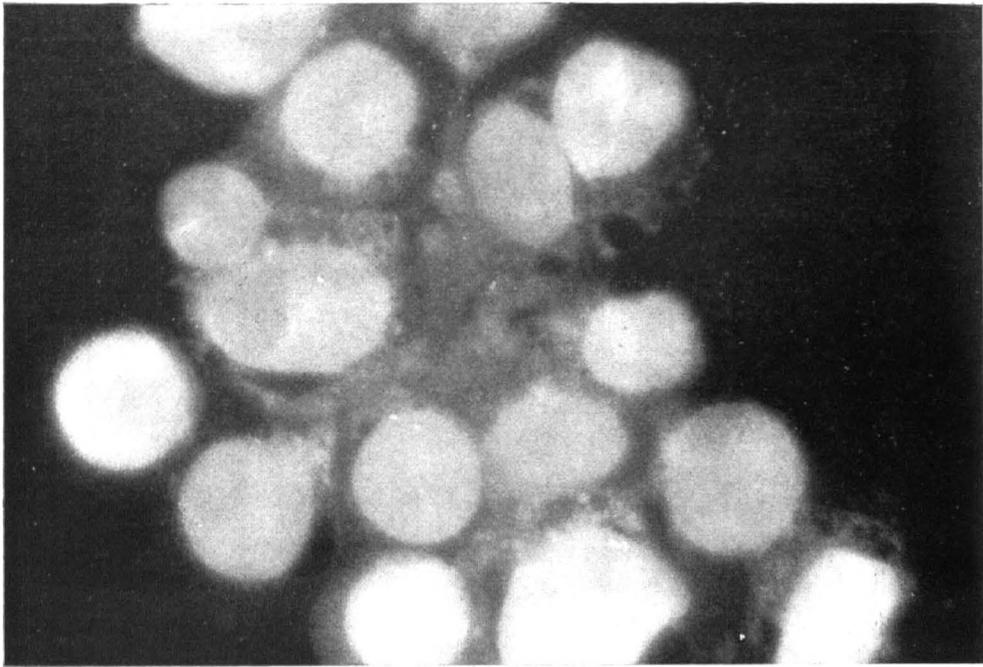
tratados con diferentes drogas psicotrópicas, comparados con 13 no tratados. En otro trabajo (21), en el año 1969, estudia cultivos procedentes de 13 pacientes tratados con clorpromacina, 15 con perfenazina y 9 con LSD; llegan a la conclusión de que la clorpromacina ejerce efectos sobre los cromosomas, pero no el LSD, sí la perfenazina.

Posteriormente, encuentran los mismos autores anteriores una frecuencia significativa de roturas, entrecruzamientos y células hipodiploides, en pacientes tratados con perfenazina y LSD, en comparación con los controles.

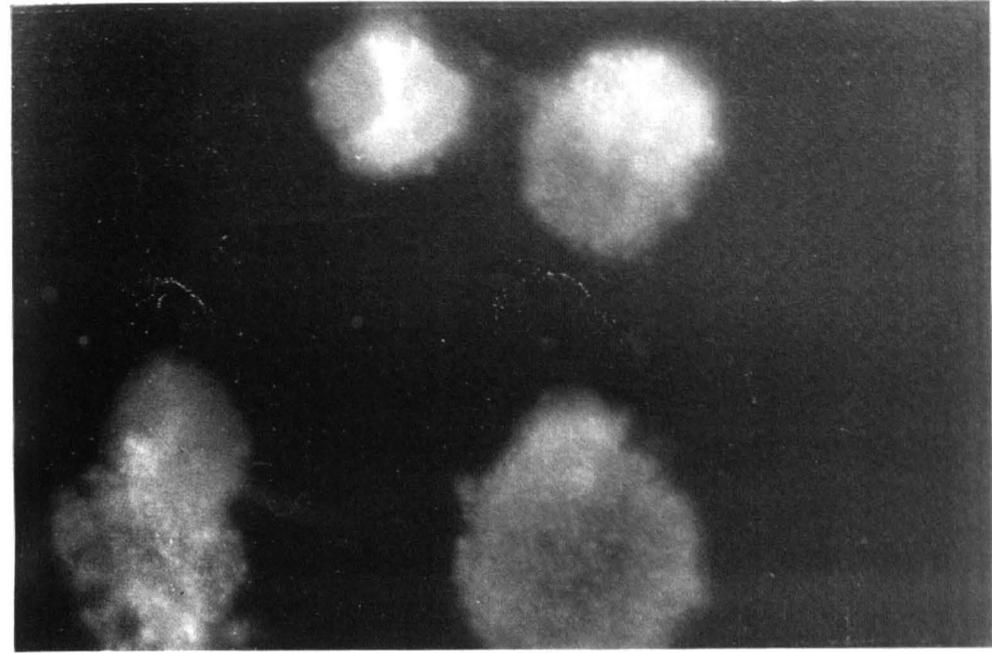
En mi trabajo he estudiado y comprobado, como se observa en el capítulo anterior, la citomorfología de los cultivos; encontramos células atípicas, células gigantes y grandes macrófagos, todas ellas fácilmente visibles por microscopia de fluorescencia. Esto está de acuerdo con los estudios de Yielding, K. L. y Sterglanz, H. (28), que señalan a la molécula del LSD como capaz de alterar la estructura del ácido desoxi-ribonucleico (ADN) *in vitro*, lo cual sugiere



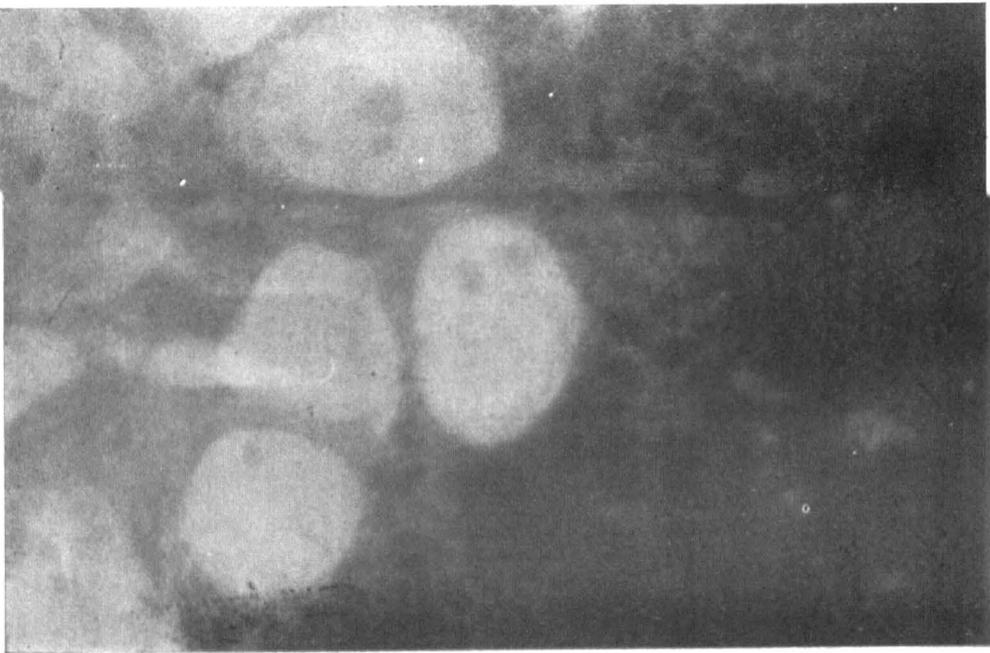
Microfotografía 4



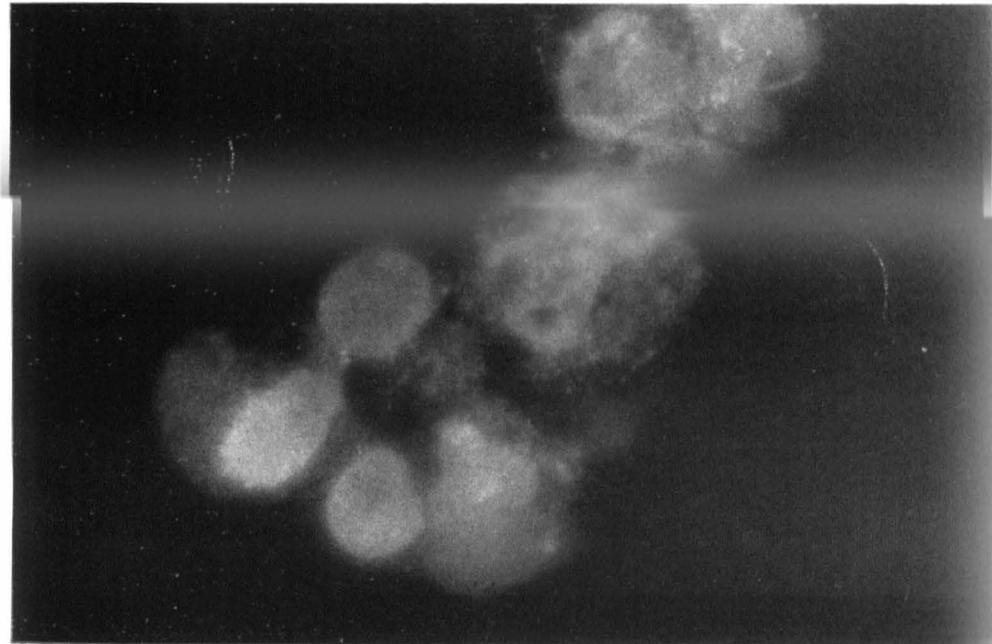
Microfotografia 5



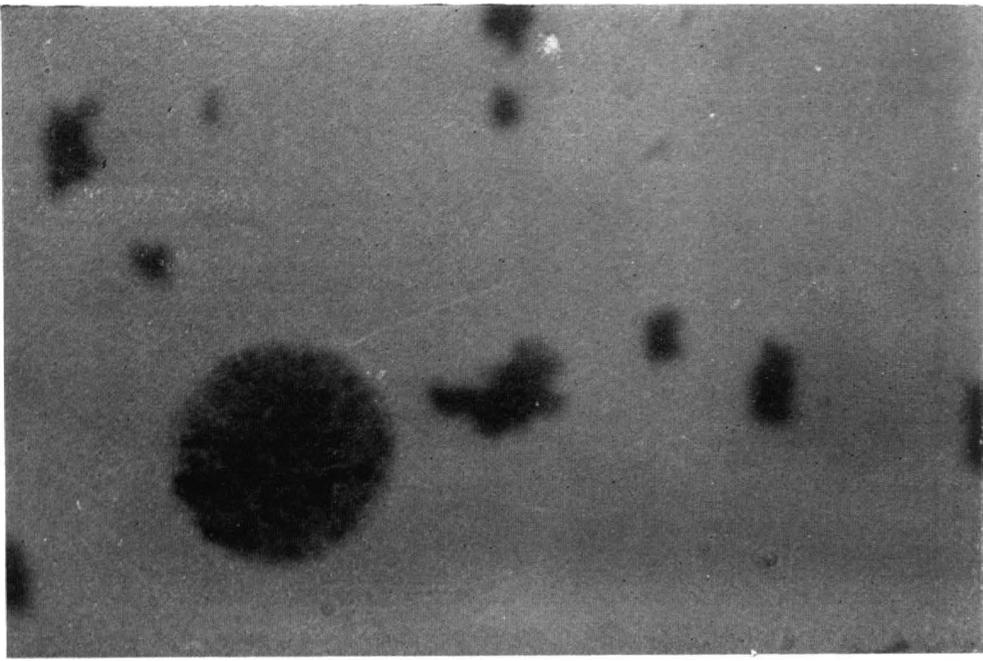
Microfotografia 7



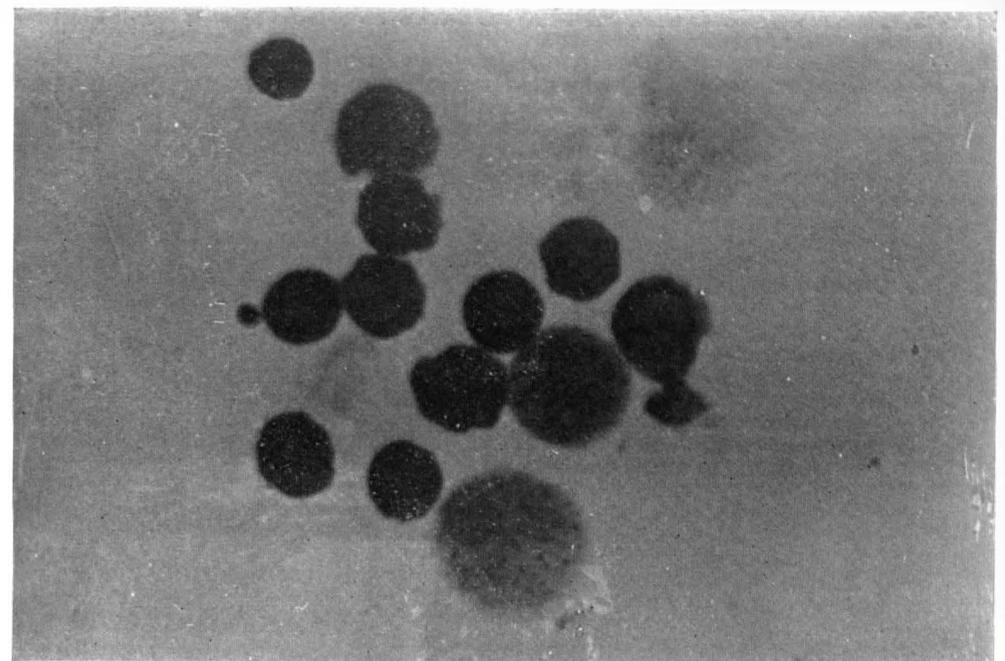
Microfotografia 6



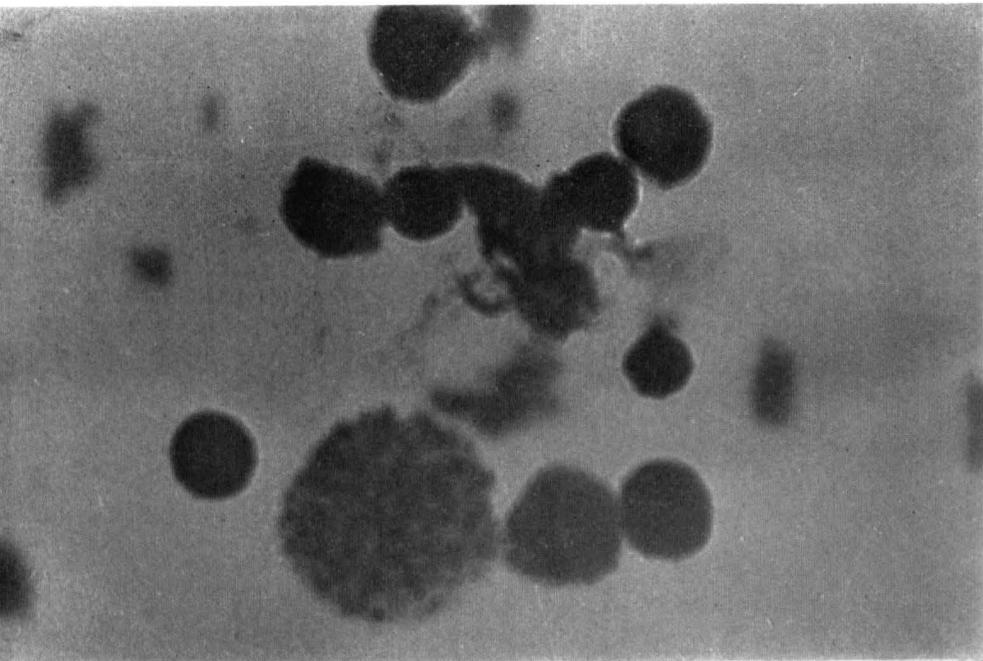
Microfotografia 8



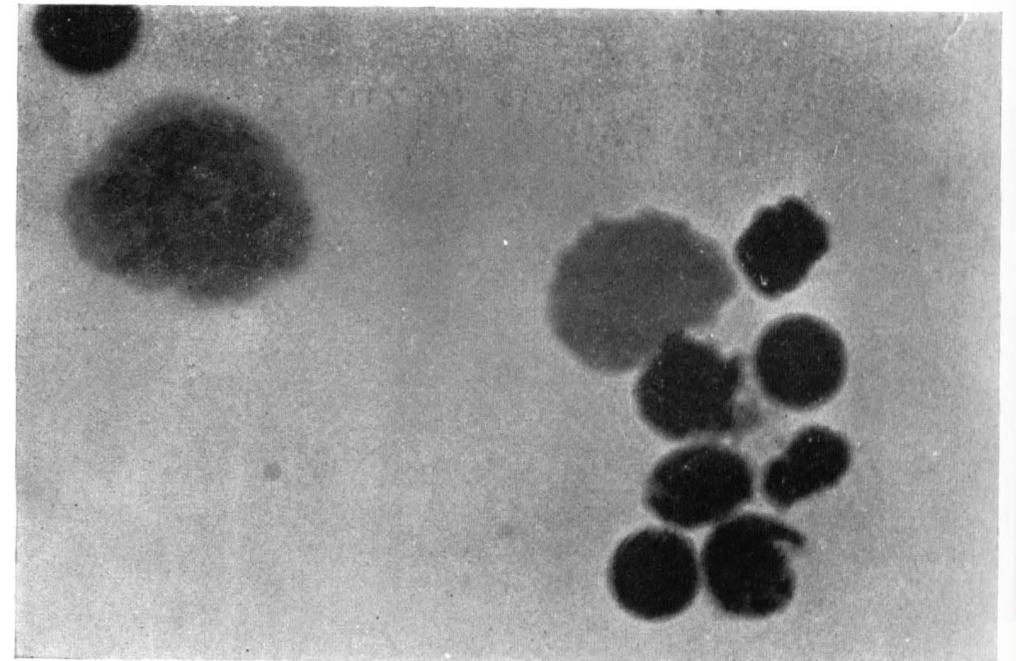
Microfotografia 9



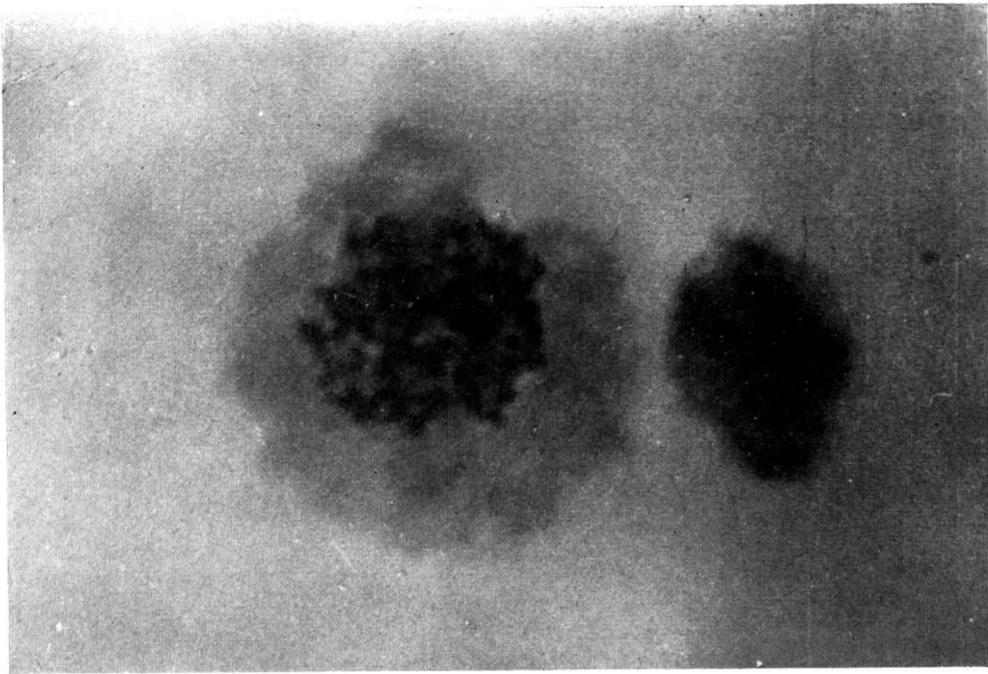
Microfotografia 11



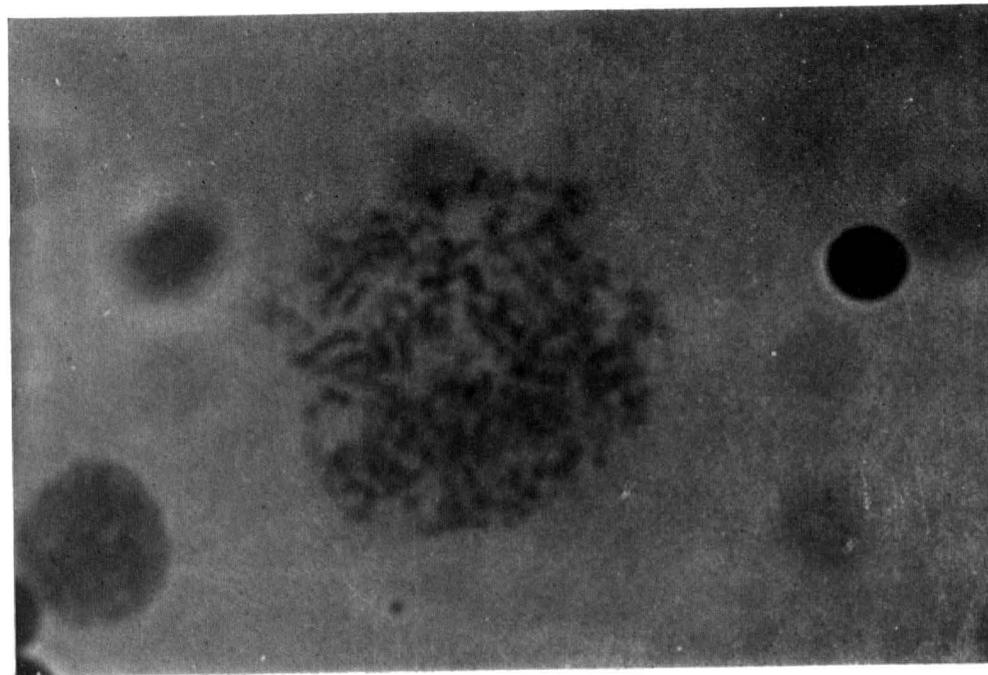
Microfotografia 10



Microfotografia 12



Microfotografía 13



Microfotografía 14

una pauta de lesividad por parte del LSD a la persona o animal que la ingiera, antes o durante la gestación, con proyección negativa para el futuro ser, explicando los casos de teratogénesis y mutagénesis *en base* de la alteración del ADN.

Si el daño ocurre, si las células permanecen lesionadas y muestran anomalías perdurables «dos líneas celulares», pueden verse afectadas.

Si son las células somáticas o corporales, la vejez celular, la inducción o la malignidad, las anomalías fetales pueden aparecer. Si las células erosionadas son gonadales puede ocurrir la esterilidad, los abortos, los nacimientos prematuros, las anomalías al nacer, submentalidad, etc.

Hemos podido apreciar la existencia de células hipodiploides, descritas ya por otros autores como ya hemos indicado antes (Nielsen, etc.), también hemos encontrado células hiperdiploides y núcleos con grandes espacios muy cromáticos.

Sofuni (23) encuentra células hipodiploides en un paciente con leucemia granulocítica aguda, y en un trabajo anterior de 1968 (24) encuentra estas células en la mayoría de los casos estudiados de leucemia mieloblástica aguda. Por lo tanto, cabe la posibilidad de relacionar el LSD con el cáncer. En este sentido hay un trabajo de Levick (13) en el que señala dos casos de coriocarcinoma testicular en individuos que habían tomado LSD durante dieciocho-veinticuatro meses de modo continuo. También David, J. y col. (6) hablan de algunas malformaciones en el sistema ocular de niños, cuyas madres han usado LSD.

De acuerdo con los trabajos citados están los estudios *in vitro* que demuestran la existencia de múltiples metafases, pero con desviaciones anormales, que posteriormente presentan los cromosomas con cromátides muy tenues, numerosos entrecruzamientos y roturas. Si bien somos partidarios de pensar en que el LSD, a dosis pequeñas y no continuadas, posiblemente no produzca malformaciones *in vivo*, sí son perceptibles *in vitro*, y de acuerdo con la mayoría de los autores pueden producirse neoplasias, por el uso continuado de esta droga que hemos estudiado, bien por ella misma o las sustancias acompañantes, o que derivan de su metabolismo.

## V. CONCLUSIONES

- 1.ª El LSD ejerce efectos sobre los cromosomas.
- 2.ª El LSD activa la multiplicación celular.
- 3.ª Hemos comprobado la existencia de entrecruzamientos y roturas en las cromátides.
- 4.ª A las veinticuatro horas de cultivo ya existen gran cantidad de linfoblastos.

5.<sup>a</sup> A las setenta y dos horas de cultivo aparecen grandes macrófagos y alteración en el ADN y ARN, como consecuencia del LSD.

6.<sup>a</sup> Las células por la acción del LSD permanecen lesionadas y muestran anormalidades perdurables.

#### VI. BIBLIOGRAFÍA

- (1) American Medical Association. Council on drugs. «Journal, Am. Med. Ass.», págs. 106-1040, 1968.
- (2) BENDER, L. y SANKAR, D. V. S.: *Chromosomal Damage Not Found in Leukocytes of Children Treated With LSD-25*, «Science», 159, 749, 1968.
- (3) COHEN, M. M.; MARINELLO, M. J. y BACK, N.: *Chromosomal Damage in Human Leucocytes induced by LSD*. «Science», 155, 1417-1419, 1967.
- (4) COHEN, M. M. y cols.: *In vivo and in vitro. Chromosomal Damage induced by LSD*, «New England J. Med.», 277, 1043-1049, 1967.
- (5) CHANCE, M. R. A.: «J. Pharmacology. Ther.», págs. 87-216, 1954.
- (6) DAVID, J., APPLE, M. D., THOMAS, O., BENNETT, M. D.: *Multiple Systemic Ocular Malformations Associated With Maternal LSD Usage*. «Arch. Ophthalmol.», vol. 92, oct. 1974.
- (7) DELAY, J.: *Psychofarmacology Frontiers*, Ed. Kline, N. S. Boston, 1959.
- (8) Díez, P.: Comunicación personal.
- (9) EGOZCUE, J.; IRWIN, S. & MARUFFO, C. A.: *Chromosome damage in LSD users*. «J. Amer. Assoc.», 204, 214-18, 1968.
- (10) IRWIN, S. & EGOZCUE, J.: *Chromosomal abnormalities in leucocytes from LSD-25 users*. «Science», 157, 314, 1967.
- (11) JARVIK, M. E.: *Drug used in the treatment of psychiatric disorders*, in Goodman, L. S. and Gilman, A. (eds.): «The pharmacological Basis of Therapeutics», Mc Millan, 1965.
- (12) KLINE, N. S.: «Wld. Hlth. Org.», 397, pág. 21, 1959.
- (13) LEVICK, L. J. y LEVICK, S. N.: *Testicular coriocarcinoma in LSD user. Coincidence or cause?* «Jama», 217-475, 1971.
- (14) LONG, SALLY, Y.: *Does LSD induce chromosomal damage and malformations. A review of the literature*. «Teratology», 6, 75-90, 1972.
- (15) LUCAS, G. T. & WOLFGANG, L.: *Chromosomal effects of LSD-25 a controversy*. «F. Arkansas med. Soc.», 6, núm. 10, 343-9, 1970.
- (16) MAIMON, M. y cols.: *Medical News*, «Jama», 201, 13-24, 1967.
- (17) MARKOWITZ, E. y KLOTZ, J. H.: *LSD-25 and Chromosomes*. «Jama», 211, 1699, 1970.
- (18) STRECKER, E. A.; PALMER, H. D. and GRANT, F. C.: *Study of prefrontal lobotomy, Neurosurgical and Psychiatric features*. «Am. Jour. of Psychiatry», 98, 524, 1942.
- (19) NIELSEN, J.; FRIEDRICH, U. y TSUBOI, T.: *Chromosomas Abnormalities and Psychotropic Drugs*. «Natures», 218, 488-489, 1968.
- (20) NIELSEN, J.; FREDERICH, U.; JACOBSEN, E. & TSUBOI, T.: *Lysergide and chromosome abnormalities*. «Brit. med. F.», 2, 801-803, 1968.

- (21) NIELSEN & TSUBOI, T.: *Chromosome abnormalities in patients treated with chlorpromazine, perphenazine and lysergide*. «Brit. med. F.», 3, 634-6, 1969.
- (22) RUMKE, CHR. L.: *Limitation of animal test. In Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics* (by Laurence, D. R. & Bacharach, A. L.), vol. 1, chapter 5, págs. 125-35. Academic Press, 1964.
- (23) SOFUNI, T. and HIROMU OKADA, M. D.: *Autoradiographic and fluorescent staining studies of bone marrow chromosomes from a patient with acute granulocytic leukemia*. «Cancers», 35, 378-384, 1975.
- (24) SOFUNI, T.; KIKUCHI, Y. and SANDBERG, A. A.: *Chronology and pattern of human chromosome replication. V. Blood leukocytes of chronic myelocytic leukemia*. «J. Natl. Cancer Inst.», 38, 141-156, 1967.
- (25) SPARKES, R. S.; MELNYK, J. y BOZZATTI, L. P.: *Chromosomal Effect in vivo of Exposure to LSD*. «Science», 160, 1343-1344, 1968.
- (26) STENCHEVER, M. A. & JARVIS, J. A.: *Lysergic acid diethylamide, LSD effect on human chromosomes in vivo*. «Amer. F. Obs. Gynaec», 106, núm. 4, 485-6, 1970.
- (27) *World Health Organization: Wld. Hlth. Org.*, «Tech. Rep. Ser», 1952.
- (28) YIELDING, K. L. y STERGLANZ, H.: *Lysergic acid Diethylamide binding to deoxyribonucleic acid*. «Proc. Soc. Expt. Med.», 128, 1096-1098, 1968.
- (29) HIRSCHRON, K.: *Medical News*. «Jama», 201, 13-24, 1967.
- (30) TJIO, J. H. and WEANG, J.: *Chromosome preparations of bone marrow cells without prior in vitro culture os in vivo colchicine administration*. «Stain Technol.», 37, 17-20, 1962.
- (31) IRWING, S. y EGOZCUE, J.: *Chromosomal Abnormalities in leucocytes, from LSD-25 Users*. «Science», 157, 313-314, 1967.