



1 - J. Amador
201

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DEL EFECTO BIOLÓGICO DEL PLOMO
CONTAMINANTE SOBRE EL PRODUCTO
DE LA CONCEPCION :**

**"Estudio del efecto letal dominante del plomo a
concentraciones ambientales simuladas; sobre la
generación F₁ de ratones machos BALB/C."**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

P r e s e n t a

MA. ANTONIA ACOSTA GARCIA

6328

MEXICO, D. F.

AGOSTO DE 1979

S.P.

13



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I N D I C E

CAPITULO I

PROLOGO

CAPITULO II

ANTECEDENTES:

1. DE LOS EFECTOS DEL PLOMO COMO PROBLEMA DE CONTAMINACION AMBIENTAL.
2. DEL METODO PARA EL DISEÑO EXPERIMENTAL DE EFECTOS LETAL DOMINANTE:
 - 2.1. Patrones de exposición
 - 2.2. Características del sistema biológico
 - 2.3. Selección del método
 - 2.4. Selección del método en función de los objetivos del estudio
 - 2.5. Características del agente
 - 2.6. Selección del método en función del sistema biológico disponible
3. DEL METODO DE ANALISIS DE RESULTADOS

CAPITULO III

OBJETIVO

CAPITULO IV

HIPOTESIS DE TRABAJO

CAPITULO V METODOLOGIA

1. DEL DISEÑO EXPERIMENTAL
2. DE LAS CONCENTRACIONES AMBIENTALES
3. DE LA IDENTIFICACION LETAL DOMINANTE EN GENERACION F₁
4. DE LOS DATOS
 - 4.1. Información obtenida
5. DE LOS METODOS DE ANALISIS DE RESULTADOS
 - 5.1. Método propuesto por Ray. V.
 - 5.2. Método de análisis de la varianza
 - 5.3. Método de χ^2

CAPITULO VI RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

1. DEL METODO PROPUESTO POR Ray. V.
2. DEL METODO DE ANALISIS DE LA VARIANZA.
3. DEL METODO DE χ^2 PARA LA INDEPENDENCIA.

CAPITULO VII

1. DISCUSION
2. CONCLUSION
3. RESUMEN
4. BIBLIOGRAFIA

CAPITULO I

PROLOGO

demostrar científicamente el efecto que producen los elementos del ambiente sobre los organismos, implica la realización de una serie de actividades de investigación que deben efectuarse con el rigor metodológico que señalan los cánones de la investigación científica, con el deseo de guiar mis conocimientos por el camino de la búsqueda científica, ejecuté todos estos cánones para realizar el estudio que describo en los capítulos siguientes.

Para este trabajo el elemento que estudié fue el plomo, la célula fue el gameto de ratones de la cepa - BALB/C y el efecto buscado fue la letalidad de la generación F_1 de estos ratones.

La primera actividad para alcanzar el propósito fue realizar una investigación bibliográfica para conocer los antecedentes de: el elemento, el organismo y variables seleccionadas. Los resultados se presentan en el Capítulo II, en el que se describen las evidencias que apoyan a los siguientes juicios planteados, derivados de reportes científicos:

1. El plomo produce daño en algunos sistemas humanos.
2. Se encuentra en derecho-habientes del I.M.S.S.
3. No se ha demostrado IN VIVO o IN VITRO efecto letal

Dominante del plomo.

4. No se ha utilizado la metodología adecuada para demostrar efectos L.D. en Generación F_1 .

En base a estos juicios, se deriva el objetivo y de este la hipótesis de trabajo que se plantea para su demostración mediante la metodología que se siguió durante todo el experimento y que se resume en el Capítulo V.

El Capítulo VI describe las características de la información obtenida y se presenta el análisis y las inferencias derivadas de estos resultados.

La Discusión se presenta en el Capítulo VII que además incluye las conclusiones, el resumen y una bibliografía que es una selección de citas de referencia que apoyan los juicios expresados en el contenido de este documento.

Esta demostración experimental tuvo como propósito personal el ser utilizada como tesis para adquirir el grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

1. DE LOS EFECTOS DEL PLOMO COMO PROBLEMA DE CONTAMINACION AMBIENTAL.

Actualmente los residentes del ambiente urbano están en contacto con una enorme variedad de productos químicos a los que sus ancestros no habfan sido expuestos por ello es posible que los pesticidas, medicamentos, cosméticos, aromatizantes, colorantes y conservadores de alimentos, y en general los contaminantes ambientales - sean capaces de producir efectos biológicos nocivos en estos sujetos tales como alteraciones hereditarias, entre otros.

Existen estudios que muestran que el plomo a concentraciones ambientales produce absorción aumentada de plomo en los humanos (9, 20, 21). Por otra parte algunos investigadores señalan que con esas concentraciones ambientales se produce daño biológico a diferentes sistemas del organismo humano y animal (6,8, 10, 11). Uno de estos sistemas afectados es el genético, como lo señalaron en sus estudios citogenéticos Schwanitz (36), - Schmid (35) y Bauchinger (3, 4).

Por otro lado Varma (38) en 1974, indicó en un estudio experimental con ratones que el plomo produce efecto Letal Dominante en la Generación F_1 de los mismos, sin embargo las concentraciones de plomo administradas a los

ratones por vía oral en el agua de uso se estimaron entre 66,000 y 100,000 mcg/g de peso, que son muy altas comparadas con las medias (\bar{X} = 10 - 40 mcg/60 Kg. de peso) encontradas en poblaciones humanas.

En un estudio realizado por el Departamento de Investigación en Salud Pública del I.M.S.S. en 1974 (13), en una muestra aleatoria calculada de la población derecho-habiente que asistió a los laboratorios clínicos, se encontró que el 3.4% del total de 3,240 sujetos estudiados, resultaron con niveles de plomo sanguíneo por arriba de 40 mcg., lo que fué considerado como absorción aumentada de plomo, por lo que se conoce que el ambiente de la Ciudad de México contiene concentraciones de plomo entre 5 mcg y 15 mcg por m³ de aire, que producen absorción aumentada de plomo en su población (7,27); también se conoce a nivel internacional que el plomo produce daño enzimático (19, 26, 29-30; 32), inmunológico (23) y genético (3-5, 25, 28, 38).

Se han realizado algunos estudios previos en busca de posibles alteraciones hereditarias producidas por el plomo. Las características de los estudios hasta ahora realizados se resumen en los Cuadros (1, 2, 3), los que se han organizado en función de los niveles de estudio - y de los métodos empleados, en ellos se señalan los patrones de exposición y algunas observaciones de carácter técnico.

Como puede apreciarse en dichos cuadros se carece de información relacionada con el estudio de los efectos biológicos del plomo con patrones de exposición y concen-

traciones similares a las del ambiente urbano.

Debido a la importancia que puede representar el posible daño genético, es necesaria la valoración de los efectos, sobre este sistema biológico, del plomo a concentraciones similares a las de la atmósfera del ambiente urbano. Por esta razón el Departamento de Investigación en Salud Pública del I.M.S.S., dentro de la línea de investigación sobre riesgos ambientales decidió realizar un conjunto de estudios sobre los efectos biológicos del plomo bajo condiciones de contaminación ambiental. En este trabajo se presentan las observaciones realizadas durante uno de estos estudios.

CUADRO 1

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES HEREDITARIAS PRODUCIDAS POR PLOMO

I. ALTERACIONES CROMOSOMICAS

1.1. ESTUDIOS EN MATERIAL BIOLÓGICO EXPUESTO "IN VITRO"

1.2. ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN MITOSIS INDUCIDAS "IN VITRO"

ESPECIE	DOSES	VIA DE ADMINISTRACION	PERIODO BIOLÓGICO	DURACION DE LA EXPOSICION	RESULTADOS	OBSERVACIONES AL DISEÑO EXPERIMENTAL	CITA
Hamster	Acetato de Pb a 325.18 mcg/ml.	In vitro	Metafasas de fibroblastos	10 horas	No encontraron alteraciones cromosomicas	Las conc. son muy altas. Especificadas	Bauchinger, M. 1972
Hombre	Acetato de Pb a 32.510* mcg/ml 3.2518* mcg/ml . 32518 mcg/ml	In vitro	Linfocitos	No especificada	Aumento en la prevalencia de aberraciones -- cromosomicas del tipo gaps y rupturas, en linfocitos de sangre periférica	No reportaron el tiempo de cultivo y las conc. son muy altas	Schwanitz. 1970
Hombre	Acetato de Pb a 3.2518 mcg/ml	In vitro	Cultivos 24 horas	24 horas 48 horas	Aumento en rupturas del tipo gaps	Dosis altas	Schmid E. 1972
Hombre	Acetato de Pb a 3.2518	In vitro	24 horas	Cultivos de 48 hrs., 24 hrs. antes del procesamiento de muestras	Lesión acromática, rompimiento de cromátides e isocromátides en Leucocitos	El Pb no modifica las alteraciones producidas por el agente Alkilante Chinon por 100 y 200 Roentgen	Bouch, B. 1974

* Cálculo estimado

CUADRO 2

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES HEREDITARIAS PRODUCIDAS POR PLOMO

1. ABERRACIONES CROMOSOMICAS
 1.1 ESTUDIOS EN INDIVIDUOS
 1.2. ESTUDIOS CITOGENETICOS EN MITOSIS INDUCIDAS " IN VITRO "

ESPECIE	DOSES	VIA DE ADMINISTRACION	PERIODO BIOLOGICO	DURACION DE LA EXPOSICION	RESULTADOS	OBSERVACIONES AL DISEÑO EXPERIMENTAL	CITA
Ratones	Acetato de Pb	Dieta	Adultos	2 semanas	Aumento en la incidencia de daño cromatide en células de médula ósea	No es posible calcular dosis por g. de peso por no haber reportado el peso y edad de los animales	Mauro A.L. 1968
Hombre	No cuantificada	Laboral en Trabajadores	Adultos	No especificada	Aumento en la prevalencia de aberraciones cromosómicas del tipo "Gaps" y rupturas en linfocitos de sangre periférica	No refirieron las características de sus controles	Bauchinger, M. 1972
Hombre	No cuantificada	Ambiental	Adultos	No especificada	Aumento en la prevalencia de aberraciones cromosómicas del tipo "Gaps" y rupturas en linfocitos de sangre periférica	No reportaron el tiempo de cultivo y las concentraciones son muy altas	Schwanitz G. 1970
Hombre	No cuantificada	Laboral fábrica de acetato de Pb	Hombres Adultos	No especificada	No encontraron diferencias	No descartaron la presencia de otros factores potencialmente capaces de producir alteraciones cromosómicas	Schmid, E. 1972
Hombre	No especificadas	Intoxicación laboral	Edad Adulta	X 7 años rango 1 a 22 años	No encontraron diferencias	No descartaron la presencia de otros factores potencialmente capaces de producir alteraciones cromosómicas	Schmid, E. 1972
Hombre	No especificadas	Laboral	Edad Adulta	X 7 años rango 1 a 22 años	No encontraron diferencias	No descartaron la presencia de otros factores potencialmente capaces de producir alteraciones cromosómicas	Schmid, E. 1972
Hombre	No especificadas	Ambiental	Edad Adulta	Toda la vida	No encontraron diferencias	No descartaron la presencia de otros factores potencialmente capaces de producir alteraciones cromosómicas	Schmid, E. 1972

CUADRO 3

ESTUDIOS DE LAS ALTERACIONES HEREDITARIAS PRODUCIDAS POR PLOMO

- I. ABERRACIONES CROMOSOMICAS:
 1.1. ESTUDIOS EN INDIVIDUO
 1.2. ESTUDIOS LETAL DOMINANTE

ESPECIE	DOSIS	VIA DE ADMINISTRACION	DURACION DE LA EXPOSICION	RESULTADOS	OBSERVACIONES AL DISEÑO EXPERIMENTAL	CITA
Ratón macho 8 semanas	+ 100,000* - 66,000 mcg/g de sub. acetato de Pb	Oral en el agua de uso	28 días	Baja en fertilidad y mutagenicidad: IM en la 3 semana - del lote tratado = 9.4 con $\chi^2 = 5.38$ ($P \geq 0.01$). IM en la semana del Lote tratado = 10.4 con $\chi^2 = 10.4$ ($P \geq 0.05$)	Dosis muy altas	Varma, M. 1974

* Cálculo estimado.

IM = Índice Mutagénico.

IM = $\frac{\text{No. total de productos no viables} \times 100}{\text{No. de implantes}}$

2. DEL METODO PARA EL DISEÑO EXPERIMENTAL DE EFECTOS LETAL DOMINANTE.

Los efectos biológicos de un agente contaminante dependen de sus propiedades físicas y químicas, de los patrones de exposición y de las características intrínsecas del sistema biológico expuesto, por esta razón es necesario hacer unas consideraciones preliminares sobre estos aspectos, ya que son determinantes para el diseño experimental.

2.1 PATRONES DE EXPOSICION

Como producto de la industrialización, el plomo se ha ido agregando al medio ambiente, fundamentalmente en el aire, agua y los alimentos, por lo que las personas se encuentran continuamente expuestas al metal. Ya que las concentraciones de este, no son homogéneas en el aire, agua y alimentos, los individuos tienen diferentes patrones de exposición; por otra parte, estas diferencias pueden atribuirse a otras fuentes de contacto tales como de tipo laboral, accidentes, manías o hábitos.

Por vía oral se absorbe el 10% del plomo ingerido y por vía respiratoria se absorbe por lo menos el 50% del plomo inhalado (21). Usualmente se ingieren 3'0 mcg. por día, de los que se absorben 3'5 mcg. En el aire urbano -

durante la mayoría de los meses del año se encuentran 5 mcg. por m³ de plomo, pero en los meses de mayores concentraciones puede incrementarse hasta 15 mcg. por m³. Si un sujeto normal de 60 kg. de peso respira 11 m³ de aire por día, su absorción por esta vía es de 30 mcg. de esta forma la absorción total es de 65 mcg. por día durante las épocas de menor contaminación que equivalen a 0.01 mcg. por gramo de peso corporal. En las épocas de mayor contaminación aérea, la absorción se incrementa a 0.02 mcg. por gramo de peso corporal. (Cuadro 4).

La existencia de diferentes patrones de exposición determina que se presenten dentro de una misma población diversos conjuntos de sujetos que pueden responder en forma diferente al contacto con el agente en estudio, debido fundamentalmente a que han desarrollado en diferente grado mecanismos homeostáticos capaces de neutralizar las modificaciones bioquímicas determinadas por el agente. Por esta razón dentro del diseño experimental deben seleccionarse para estudio elementos provenientes de uno sólo de estos conjuntos o simularse las circunstancias a las que están sometidos cada uno de estos conjuntos, por lo tanto es necesario realizar observaciones bajo condiciones de exposición aguda, subaguda y crónica. En el presente trabajo se pretenden realizar observaciones bajo condiciones de exposición aguda, por ser el primero de una serie de estudios.

Debido a que existen graves problemas técnicos para la producción de atmósferas con concentraciones constan-

tantes y controladas de plomo, no es factible simular - desde este punto de vista las características de exposición humana. Sin embargo al considerar que el interés básico de estos estudios es la identificación del efecto biológico del metal a concentraciones y exposiciones similares a las del ambiente urbano, es conveniente administrar el metal en el agua de uso con lo que se obtiene una exposición gradual distribuida durante el tiempo de exposición; no es pertinente seleccionar la administración intragástrica o parenteral de uso habitual en estudios farmacológicos, ya que de esta forma se expondría súbitamente al animal a concentraciones extraordinariamente altas que no son observables en circunstancias habituales. No obstante ello debe reconocerse que al variar la vía y el patrón de administración se puede modificar la respuesta, pero la decisión tomada esta más próxima a la realidad.

No se dispone de evidencias que permitan sustentar la decisión de las concentraciones equivalentes de plomo entre diferentes especies, desde el punto de vista estricto, la única forma de identificar dosis equivalentes, es mediante estudios paralelos en las especies que interesa estudiar, por esta razón la decisión final es arbitrarfa y a juicio de cada grupo de investigadores. Puesto que el plomo se distribuye en todo el organismo, se considera conveniente seleccionar como dosis equivalentes, en el diseño experimental, las dosis por gramo de peso.

CUADRO 4

CALCULO DE PLOMO ABSORBIDO POR HABITANTE, BAJO DIFERENTE CONCENTRACIONES DE CONTAMINACION AEREA

Basados en los datos de un sujeto de 60 kg. de peso

$$\text{mcg de plomo absorbidos en un día por gramo de peso} = \frac{\text{Concentraciones del plomo en aire ambiental mcg x m}^3}{2} \times \frac{\text{Volumen respiratorio}}{10} + \frac{\text{Plomo ingerido por vfa oral en mcg}}{10}$$

Peso corporal (60,000 g)

CONCENTRACION DE PLOMO EN EL AIRE AMBIENTAL (mcg/m ³)	Volumen RESPIRATORIO	PLOMO INGERIDO POR VIA ORAL	CALCULO	mcg POR GRAMO DE PESO POR DIA
15	12	350	$\frac{15(12)}{2} + \frac{350}{10}$ 60,000 gramos	= 0.02083
21	12	350	$\frac{20(12)}{2} + \frac{350}{10}$ 60,000 gramos	= 0.02583
44	12	350	$\frac{40(12)}{2} + \frac{350}{10}$ 60,000 gramos	= 0.04583

2.2. CARACTERISTICAS DEL SISTEMA BIOLÓGICO.

Por lo que respecta a las características intrínsecas del sistema biológico expuesto, estas son determinantes en las respuestas observadas debido fundamentalmente a las diferencias entre las sensibilidades de sus procesos bioquímicos al agente en estudio, por esta razón es necesario realizar estudios sobre cada uno de los conjuntos de elementos que biológicamente tengan las mismas características intrínsecas. Desde el punto de vista considerado, es de esperarse que exista una diferencia en la respuesta al plomo cuando se exponen sistemas biológicos como células somáticas o células germinales; si el objetivo del estudio es el de identificar los riesgos sobre el producto de la concepción existen indicios que apoyan como la mejor decisión el seleccionar inicialmente como sistema biológico para estudio las células germinales.

2.3. SELECCION DEL METODO.

Los agentes químicos son potencialmente capaces de producir todo tipo de mutaciones, es decir son capaces de producir cambios en el material genético que pueden variar desde alteraciones en un sólo gen o mutaciones puntuales, hasta modificaciones en un conjunto de genes o mutaciones estructurales. En la actualidad se cuenta

con métodos útiles para detectar este tipo de alteraciones en diferentes sistemas biológicos, desde bacterias - hasta mamíferos, pero la selección del método a emplear debe hacerse en función del objetivo del estudio, de las características del agente sospechoso y del sistema biológico disponible, las alternativas de elección suelen reducirse a métodos citogenéticos, prueba de Letal Dominante y estudio con huésped intermediario (24). Este -- último sirve fundamentalmente para detectar los productos con propiedades mutagénicas que pudieran ser formados como resultado del metabolismo del huésped y para indagar si este es capaz de neutralizar la actividad mutagénica del compuesto. Por lo que respecta a los métodos citogenéticos, sirven para identificar grandes mutaciones que -- son perceptibles al microscopio usualmente se buscan en mitosis inducidas "in vitro" en células germinales, en -- linfocitos o fibroblastos.

La Prueba Letal Dominante se basa en el estudio de la progenie engendrada de animales tratados con agentes sospechosos de ser potencialmente mutagénicos. Con esta prueba se detectan mutaciones letales, es decir cambios en el material genético que son incompatibles con la -- supervivencia del producto de la concepción. (2, 16,17).

2.4. SELECCION DEL METODO EN FUNCION DE LOS OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

Desde el punto de vista de Salud Pública interesa

ante todo identificar los agentes que son capaces de producir alteraciones hereditarias en el producto de la concepción humana, las concentraciones mínimas capaces de producir tales efectos, las condiciones de exposición en los que estos se presentan y la identificación de los sujetos susceptibles en función de sus características biológicas intrínsecas.- Por lo que el método de estudio a elección será aquel que mejor cumpla con estos requisitos.

2.5. CARACTERISTICAS DEL AGENTE

Ya que el plomo es un elemento, desde el punto de vista teórico no es posible que sufra degradación dentro del organismo, por lo que no se tienen bases para sospechar la formación de subproductos potencialmente nocivos; en cuanto a los compuestos que pueden formar el plomo dentro del organismo, hasta la fecha no se ha logrado identificar alguno activo biológicamente, por esta razón parece ser por ahora no muy importante el empleo del método del huésped intermediario. Este método sería útil para estudiar riesgos en sujetos expuestos laboral o accidentalmente a alguno de los compuestos de plomo de uso industrial tal como el tetraetilo de plomo.

2.6. SELECCION DEL METODO EN FUNCION DEL SISTEMA BIOLÓGICO DISPONIBLE.

Es obvio que para los objetivos de la Salud Pública el sistema biológico de elección es el humano, sin embargo por razones éticas y prácticas no es posible -- realizar en este sistema biológico un estudio en el que se cumplan todos los objetivos ya presentados, el único tipo de estudio factible en individuos humanos es uno -- de carácter testimonial, por lo que la obtención de evidencias debe hacerse en otros sistemas biológicos.

Desde el punto de vista práctico la elección del -- sistema biológico se hace en el nivel de equilibrio de -- dos factores fundamentales uno de ellos son los recursos disponibles y el otro la mayor proximidad filogenética y biológica con el hombre. Aunque la decisión sea la óptima, desde los puntos de vista considerados, siempre surge el problema de la extrapolabilidad de las observaciones, pues la única manera de validarla sería la realización de estudios paralelos.

De acuerdo con las consideraciones previas se eligió como método la prueba Letal Dominante en el ratón debido fundamentalmente a:

- 1) El elemento objetivo que se valora es el producto de la concepción.
- 2) El órgano blanco en el que se detectan los efectos -- del agente en estudio son las gametas.

- 3) Se realizan observaciones en mamíferos.
- 4) Por su factibilidad en función de disponibilidad, tiempo de reproducción y posibilidades técnicas.

3. DEL METODO DE ANALISIS DE RESULTADOS

Uno de los problemas para demostrar los efectos del plomo han sido la validez de los métodos empleados en el diseño y el análisis de resultados, como lo demuestra la controversia existente entre los diferentes reportes de la Bibliografía Internacional (14, 16, 17, 31), acerca de la técnica de análisis de resultados que debe utilizarse para demostrar el efecto en la generación F_1 como lo señala Salsburg (34) y Legator (24). Por lo que se hace necesario comparar los diferentes métodos de análisis de resultados usados por los investigadores para conocer su validez. El presente estudio compara los procedimientos estadísticos χ^2 , análisis de la varianza y un método de índices propuesto por Ray. V. (33).

CAPITULO III
OBJETIVO

Mostrar experimentalmente si el plomo a concentraciones ambientales administradas a ratones machos BALB/C, produce alteraciones Letal Dominante (L.D.) en su generación F_1 .

CAPITULO IV
HIPOTESIS DE TRABAJO

El plomo a concentraciones ambientales simuladas aplicadas a ratones machos BALB/C, no produce efecto Letal Dominante en la Generación F₁.

CAPITULO V METODOLOGIA

1. EL DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Se formaron cuatro lotes de tratamiento con diez ratones machos cada lote, el primer lote (T₀) fue el control y tres lotes (T₁, T₂, T₃) experimentales.

2. DE LAS CONCENTRACIONES AMBIENTALES

2. Los tratamientos fueron administrados mediante una solución de acetato de Plomo por vía oral, como maniobra única de aplicación a los ratones machos. Los tratamientos (T) (Cuadro 5), corresponden a las siguientes dosis:

TRATAMIENTO-DOSIS

$$T_0 = \text{Pb } 0.0 \text{ mcg/ml}$$

$$T_1 = \text{Pb } 0.11 \text{ mcg/ml}$$

$$T_2 = \text{Pb } 0.14 \text{ mcg/ml}$$

$$T_3 = \text{Pb } 0.26 \text{ mcg/ml}$$

Estas dosis fueron calculadas a partir de los mcg de Pb absorbidos en un día por g. de peso

(22).

Se sacrificó a todas las hembras gestantes, 11 días después de encontrarles tapón vaginal.

Se localizó útero extrayendo los productos de la concepción para identificarlos como: productos viables y productos no viables; estos últimos fueron identificados histológicamente como deciduomas.

CUADRO 5

CARACTERISTICAS DE LA APLICACION DE LA MANIOBRA

GRUPOS ESTUDIADOS	No. DE RATONES MACHOS HEMBRA/C	PROCEDIMIENTO DE APAREAMIENTO	CONCENTRACION ATMOSFERICA SIMULADA*(mcg/m ³)	DOSIS ORAL POR mcg/g DE PESO POR DIA	CONCENTRACION DE LA SOLUCION DE ACETATO DE PLOMO (mcg/ml)
CONTROL	10	3 ratones hembras durante 4 semanas	0	0.00	0.00
I	10	3 ratones hembras por semana durante 4 semanas	15	0.020	0.11
II	10	3 ratones hembras por semana durante 4 semanas	21	0.025	0.14
III	10	3 ratones hembras por semana durante 4 semanas	44	0.046	0.26

* Calculada para un hombre de 60 kg. de peso con una frecuencia respiratoria de 20

4. DE LOS DATOS

Los datos fueron obtenidos de los siguientes eventos observados:

1. Número de ratones machos
2. Número de ratones hembras embarazadas
3. Número total de implantaciones
4. Número de productos viables/macho
5. Número de productos no viables/macho

4.1 INFORMACION OBTENIDA

Los resultados fueron registrados diariamente en una bitácora.

5. DE LOS METODOS DE ANALISIS DE RESULTADOS

Se elaboraron los siguientes indicadores:

5.1 METODO PROPIUESTO POR RAY.V.

1. No. total de

$$\frac{\text{implantaciones}}{\text{Total de hembras embarazadas}}$$

2.
$$\frac{\text{No. total de productos viables}}{\text{No. total de hembras embarazadas}}$$
3.
$$\frac{\text{No. total de productos no viables}}{\text{No. total de hembras embarazadas}}$$
4.
$$\frac{\text{No. total de productos no viables}}{\text{No. total de implantes}} \times 100$$

5.2 METODO DE LA VARIANZA

$$5. \quad X_{ij} = \frac{\text{No. total de productos viables}}{\text{No. total de implantes}} \times \text{No. de ratones por T}$$

$$6. \quad \dot{X}_{ij} = X_{ij} \times \text{semana} \times \text{tratamiento}$$

5.3 METODO DE χ^2

$$7. \quad \frac{\text{No. total de implantes viables}}{\text{Tratamiento}}$$

8. No. total de implantes
no viables
Tramienito

CAPITULO VI

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Se estableció la siguiente hipótesis nula: No existen diferencias significativas entre los resultados de los tres procedimientos empleados y se aplicaron tres procedimientos estadísticos a los datos, cuyos resultados se describen a continuación:

1. DEL METODO PROPUESTO POR RAY. V. (33)

En el Cuadro 6, se observan: decremento significativo de 5.11 ($\alpha = .05$) en la relación productos viables/hembras embarazadas para el grupo de ratones de la semana 4 - tratamiento 3, comparado con la $\bar{X} = 6.35$ del grupo control; en la relación productos no viables/hembras embarazadas del grupo de ratones machos de la semana 1 tratamiento 3, se observa un incremento significativo de - 2.41 ($\alpha = .05$) comparado contra la $\bar{X} = 1.41$ del grupo -- control.

Para verificar estos resultados significativos mediante la reproducibilidad, se separaron los grupos de 10 ratones machos en 2 subgrupos de 5 ratones cada uno y se les aplicó el mismo procedimiento estadístico, Cuadros (7 y 8), donde se observa que los datos no son reproducidos consistentemente en ambos subgrupos.

Para la relación productos viables/hembras embarazadas, sólo el segundo subgrupo de la semana 4 - tratamiento 3, presenta decremento significativo de 2.67 - - ($\alpha = .05$) comparado contra la $\bar{X} = 6.27$ del grupo control, mientras que en el primer subgrupo se observa decremento 6.33 que no es significativo.

Además, en el primer subgrupo de ratones machos -- aparece en la semana 1 - tratamiento 3 un decremento - significativo de 4.44 ($\alpha = .05$) no reproducido en el segundo subgrupo de ratones machos.

En la relación productos no viables/hembras embarazadas, se observa para la semana 1 - tratamiento 3 un - incremento significativo de 2.78 ($\alpha = .05$) en el primer subgrupo de ratones machos que no es reproducido este - incremento significativo ($\alpha = .05$) en el segundo subgrupo de ratones machos.

CUADRO 6

EFFECTO LETAL DOMINANTE EN GENERACION F₁ DEL TOTAL DE RATONES BALB/C
 AGRUPADOS POR LOTES DE TRATAMIENTO POR SEMANA

SEMANA	No. total de implantes				No. total de Prod. viable				No. total Prod. no viable				No. total Prod. no viable			
	No. total de hembras embarazadas				No. total de hembras embarazadas				No. total de hembras embarazadas				No. total de implantes X 100			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
1	7.40	7.95	7.55	8.18	6.23	6.85	5.90	5.76	1.15	1.10	1.65	<u>2.41</u>	15.6	13.8	21.9	29.5
2	7.60	7.80	8.74	8.39	6.35	6.55	7.74	7.28	1.25	1.25	1.00	1.11	16.4	16.0	11.4	13.2
3	7.83	7.75	8.23	7.33	5.83	6.8	7.18	6.25	2.0	0.95	1.05	1.08	25.5	12.3	12.7	14.7
4	8.25	8.00	7.77	6.33	7.00	6.35	5.61	<u>5.11</u>	1.25	1.65	1.57	1.22	15.2	20.6	21.8	19.3
\bar{x}	7.8	7.9	8.1	7.6	<u>6.35</u>	6.64	6.61	6.10	<u>1.41</u>	1.24	1.31	1.45	18.2	15.6	16.9	19.2

Nivel de significación al 5%, cuando la relación implantes muertos/total de implantes X 100 < S tomando de V.A. Ray (33)

CUADRO 7

EFFECTO LETAL DOMINANTE EN GENERACION F_1 DEL SUBGRUPO 1 DE 5 RATONES
MACHOS BALB/C AGRUPADOS POR LOTES DE TRATAMIENTO POR SEMANA

SEMANA	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
1	7.13	7.56	7.63	7.22	6.0	6.60	6.25	<u>4.44</u>	1.13	.89	1.38	<u>2.78</u>	15.8	11.8	18.0	38.5
2	7.50	7.89	8.82	7.40	6.1	6.59	7.55	6.10	1.42	1.33	1.28	1.3	19	16.9	14.4	17.6
3	8.13	7.27	8.60	8.0	6.38	6.64	7.70	6.66	1.75	.64	.9	1.33	21.5	8.8	10.5	16.6
4	8.22	7.70	6.87	7.5	7.22	6.20	5.60	<u>6.33</u>	1.0	1.5	1.26	1.17	12.1	19.5	18.4	15.6
\bar{x}	7.75	7.61	7.98	7.53	<u>6.43</u>	6.49	6.78	5.88	<u>1.33</u>	1.09	1.21	1.64	17.1	14.3	15.3	22.1

CUADRO 8

EFFECTO LETAL DOMINANTE EN GENERACION F₁ DEL SUBGRUPO 2 DE 7 RATONES
MACHOS BALB/C AGRUPADOS POR LOTES DE TRATAMIENTO POR SEMANA

SEMANA	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
1	7.8	8.27	7.5	9.25	6.6	7.0	5.66	<u>7.25</u>	1.2	1.27	1.83	2	15.4	15.4	14.4	21.6
2	7.75	7.73	8.66	9.63	6.75	6.55	7.92	8.75	1.0	1.18	.75	.88	13.0	15.3	8.7	9.1
3	7.6	8.33	7.92	5.33	5.4	7.0	6.75	5.0	2.2	1.33	1.17	.33	29	16	14.7	6.3
4	8.33	8.43	7.7	4.0	6.33	6.57	5.63	<u>2.67</u>	2.0	1.86	2.13	1.33	24	22	27.4	33.3
\bar{x}	7.87	8.19	7.71	7.1	<u>6.27</u>	6.78	6.49	6.0	1.6	1.41	1.47	1.14	20.4	17.2	18.8	17.6

2. DEL METODO DE ANALISIS DE LA VARIANZA (1°)

Los datos fueron elaborados de la relación productos viables/total de implantes de la generación F_1 de los ratones machos. Se aplicó análisis de la varianza a los datos obtenidos en la primera semana de apareamiento, para contrastar las diferencias entre las medias de los cuatro grupos de tratamientos, los resultados se muestran en el Cuadro 9 donde se observa. Que el cuadrado medio de las medias $S_m^2 = 0.0436$ (cálculo directo de la varianza de las medias y estima a σ^2) y el cuadrado medio, dentro de los grupos $S_p^2 = 0.0352$ (estimación centrada de σ^2), estas cantidades S_m^2 y S_p^2 se contrastan para ver si hay diferencia significativa usando la razón F, donde

$$F \text{ observada} = 1.238$$
$$\text{y } F_{0.95} (36, 33) = 1.84$$

Como $F \text{ observada} = 1.24 < F_{0.95} (36, 33) = 1.84$, no es significativa ($\alpha = .05$). También se practicó análisis de varianza a los datos obtenidos en la tercera semana de apareamiento posterior a la aplicación de tratamientos (Cuadro 10), donde se observa que $F \text{ observada} = 1.13 < F_{0.95} (34, 37) = 1.84$, no es significativa ($\alpha = .05$).

Además, se estableció la siguiente hipótesis nula:

No existen diferencias en las medias de las categorías (tratamientos y semanas de apareamiento) contras-

tadas con un nivel de significación del 5%.

Los resultados se presentan en el Cuadro 11 donde se observa que la razón F observada = $0.21 \leq F_{0.95} -- (15, 268) = 2.1$ no es significativa ($\alpha = .05$).

CUADRO 9

ANALISIS DE LA VARIANZA POR CATEGORIAS (TRATAMIENTOS-GRUPOS DE EMBARAZADAS) DURANTE LA PRIMER SEMANA DE APAREAMIENTOS

	SUMA DE CUADRADOS S.C	GRADOS DE LIBERTAD G.L	CUADRADO MEDIO C.M.	R A Z O N F
MEDIAS (entre los grupos)	1.57	36	0.0436	F OBSERVADA $F = \frac{.0436}{.0352} = 1.24$
DENTRO (de los grupos)	1.16	33	0.0352	F CALCULADA $F = 1.24 \leq F_{0.95}(36, 33) = 1.84$
TOTAL	2.73	69		

CUADRO 10

ANALISIS DE LA VARIANZA POR CATEGORIAS (TRATAMIENTOS GRUPOS DE EMBARAZADAS) DURANTE LA TERCERA SEMANA DE APAREAMIENTO

	SUMA DE CUADRADOS S.C.	GRADOS DE LIBERTAD G.L.	CUADRADO MEDIO C.M.	R A Z O N F
MEDIAS (entre los grupos)	1.161	34	0.03414	F OBSERVADAS $F = \frac{0.034}{0.02881} = 1.18$
DENTRO (de los grupos)	1.095	37	0.02881	F CALCULADA $F = 1.18 < F_{0.95}(34, 37) = 1.84$
TOTAL	2.256	71		

CUADRO 11

ANALISIS DE LA VARIANZA POR CATEGORIAS (TRATAMIENTOS-
SEMANAS DE APAREAMIENTO)

	SUMA DE CUADRADOS S.C.	GRADOS DE LIBERTAD G.L.	CUADRADO MEDIO C.M.	R A Z O N F
MEDIAS (entre los grupos)	0.992	15	0.06613	F, OBSERVADA $F = \frac{0.00661}{0.03111} = 0.21$
DENTRO (de los grupos)	8.338	268	0.03111	F, CALCULADA $F = 0.21 \ll F.95 (15, 268) = 2.1$
TOTAL	9.33	283		

3. DEL METODO DE χ^2 PARA LA INDEPENDENCIA (2)

Se clasifican las observaciones por dos características: viabilidad de los productos de la Generación F_1 y tipo de tratamiento, y se establece la hipótesis:

La distribución de las dos características son independientes.

Los resultados se presentan por tipo de tratamiento y por semana de apareamiento en el Cuadro 12 donde se observa que en la semana 1-tratamiento 3, la χ^2 -- observada = 5.99 $>$ $\chi^2(\alpha = .05) = 3.84$, rechazándose la hipótesis de independencia con el nivel de significación del 5%.

También se observa significancia ($\alpha = .05$) en los grupos tratamiento 1 y 2 de la semana 3 con χ^2 observada = 8.65 y 8.81 respectivamente $>$ 3.84, rechazándose la hipótesis de independencia.

CUADRO 12

ANALISIS DE χ^2 POR CATEGORIAS (VIABILIDAD DE LOS PRODUCTOS-TRATAMIENTOS)
DURANTE LAS CUATRO SEMANAS DE APAREAMIENTOS

	T1*	T2*	T3*
SEMANA 1	χ^2 observada = 0.15 < χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84	χ^2 observada = 1.45 < χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84	χ^2 observada = 5.99 > <u>χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84</u>
SEMANA 2	χ^2 observada = 0.01 < χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84	χ^2 observada = 1.87 < χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84	χ^2 observada = 0.63 < χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84
SEMANA 3	χ^2 observada = 8.65 > <u>χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84</u>	χ^2 observada = 8.81 > <u>χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84</u>	χ^2 observada = 3.75 < χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84
SEMANA 4	χ^2 observada = 1.13 < χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84	χ^2 observada = 1.78 < χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84	χ^2 observada = .45 < χ^2 ($\alpha = .05$) = 3.84

* SE COMPARAN CONTRA TO ENTRE PRODUCTOS VIABLES Y NO VIABLES.

CAPITULO VIII

D I S C U S I O N

Para conocer el potencial mutagénico de sustancias contaminadas o drogas en modelos mamíferos, se requiere que el diseño experimental de ensayos Letal Dominante se caracterice en sus resultados por incremento estadísticamente significativo en la proporción de productos no viables de la Generación F_1 , acompañado de decremento estadísticamente significativo en la proporción de productos viables de la misma generación.

Para determinar si existen estas respuestas mutagénicas, se han propuesto varios procedimientos estadísticos para analizar resultados experimentales y validar las conclusiones que son guías de la interpretación experimental (34).

Para analizar los resultados de este experimento se seleccionaron el método propuesto por Ray, V. (33), el análisis de varianza y las tablas de contingencia de X^2 con el fin de obtener mediante comparación analítica, el método que proporcione mayor validez para las inferencias. Al aplicar la modificación del método propuesto por Ray, V. se obtuvo incremento significativo de los productos no viables del lote de 10 ratones machos BAL3/C correspondientes al tratamiento 3 - semana 1, sin embargo no se acompañó de decremento significativo de los productos viables como se observa en el Cuadro 6. Para que

este incremento de los productos no viables será considerado válido para inferir que el tratamiento 3 produce efecto Letal Dominante en la Generación F₁ durante la primera semana de apareamiento posterior a la manobra, es necesario que se manifieste en todos los ratones machos del lote tratamiento 3 semana 1, por lo cual se separó a los 10 ratones machos en dos subgrupos de 5 ratones machos cada uno para determinar la reproducibilidad de los datos; encontrando como lo demuestran los Cuadros 7 y 8, que sólo en el primer subgrupo de ratones machos aparece un incremento significativo - ($\alpha = .05$), lo que hace sospechar un resultado falso positivo.

Por una parte se podría inferir que con esta dosis de plomo (0.26 mcg/ml) se produce efecto Letal Dominante en la Generación F₁ y por otra sería sospechar un resultado falso positivo, por lo que se decidió aplicar el mismo método de análisis para observar la reproducibilidad de los datos como se demuestra en los Cuadros 7 y 8; encontrando que estos datos no se reproducen similarmente en ambos subgrupos, por lo cual se confirma esta alternativa contradictoria.

Para poder corroborar esta inferencia de un resultado falso positivo, primero se aplicó un análisis de la varianza para observar si existía variabilidad en la Generación F₁ entre cada ratón macho y por grupo de tratamiento durante la primera semana de apareamiento, encontrando que no existe diferencia significativa ($\alpha = .05$)

entre las medias con F observada = 1.24 \angle F calculada 0.95 = 1.84, Cuadro 9.

De la misma manera aplicando el mismo método de análisis para la tercera semana, se encontró que no existen diferencias significativas ($\alpha = .05$) en las medias de F_1 , entre los ratones machos y entre los grupos de tratamiento, con F observada = 1.18 \angle F calculada 0.95 = 1.84. Cuadro 10.

Posteriormente se aplicó a los mismos datos el método de χ^2 para observar la independencia entre la calidad del producto de la Generación F_1 respecto de los diferentes tratamientos, encontrando para la semana 1 tratamiento 3 un efecto significativo ($\alpha = .05$) de dependencia similar al método propuesto por Ray. V.

Con estos análisis se infiere que a pesar de que aparecen efectos significativos en la Generación F_1 del tratamiento 3, por los métodos de la χ^2 y el propuesto por Ray. V. el análisis de la varianza y el análisis de reproducibilidad nos hacen sospechar en este grupo de ratones de la semana 1 - tratamiento 3 la existencia de resultados falsos positivos.

Para observar el efecto del plomo en diferentes estados de espermatogénesis, se aplicaron los mismos métodos de análisis a los datos resultantes de las diferentes semanas de apareamiento. Al aplicar el método propuesto por Ray. V. en las diferentes semanas, observamos decremento significativo ($\alpha = .05$) de los productos viables en la semana 4 - tratamiento 3, pero no se obser-

va incremento significativo en los productos no viables, Cuadro 6; que es atribuible al realizar la reproducibilidad del segundo subgrupo de ratones. Cuadro 8.

Cuando se aplicó el análisis de varianza a los grupos por semanas de apareamiento - tratamientos, no se encontró diferencias significativas, f observada = 0.21

$\leftarrow F$ Calculada $0.95 = 2.1$

Cuando se aplicó el análisis de χ^2 a los mismos datos se observó que en la semana 3 los grupos de tratamiento 1 y 2 son significativos ($\alpha = 0.05$), pero esta es atribuible a incremento de los productos viables, no decremento de los mismos, que sería el efecto del plomo.

2. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se presentan evidencias que sugieren que el plomo a las concentraciones probadas no causa efecto Letal Dominante en la Generación F_1 de los ratones machos BALB/C en las cuatro primeras semanas de apareamiento posteriores al tratamiento único, corroborándose la hipótesis general.
2. Los tres procedimientos de análisis estadístico

co empleados, producen resultados diferentes entre si.

3. El uso simultáneo de tres técnicas de análisis estadístico para observar efectos de sustancias mutagénicas, permite sospechar y demostrar resultados falsos positivos atribuibles a variables independientes del proceso medido. Sin embargo el método que se recomienda para analizar este tipo de investigaciones, es el análisis de la varianza.
4. Es necesario continuar con estudios similares para corroborar las evidencias encontradas en este estudio.
5. No hay que olvidar las mutaciones que se pueden producir en genes letales recesivos, que podrían ser transmitidos a través de muchas generaciones, y difundirse a muchos individuos, antes que lleguen a manifestarse abiertamente, el efecto de los genes letales recesivos puede tardar mucho más tiempo que el de los letales dominantes, pero eso no los hace menos indeseables.

3. RESUMEN

El propósito de este documento fue presentar evidencias que apoyan la tesis de que el plomo no produce ningún efecto Letal Dominante en la Generación F_1 de los ratones BALB/C. Se probó la hipótesis que se sustentó que fue: El plomo a concentraciones ambientales simuladas aplicadas a ratones machos BALB/C, no producen efecto Letal Dominante en la Generación F_1 .

Se presentaron evidencias sobre la veracidad de los datos analizados por diferentes métodos estadísticos. - Al final en las conclusiones se incluyen tres diferentes métodos de análisis estadístico que son el propuesto por Ray. V., Análisis de Varianza y Análisis de χ^2 , así como la necesidad de repetir este experimento durante varias ocasiones para demostrar las evidencias obtenidas

4. BIBLIOGRAFIA

- 1) Bateman, A.J.: "Pharmacology Testing Chemicals for mutagenicity in a mammal". *Nature* 210: 205-206. 1966.
- 2) Bateman, A. J. & Epstein, S. S.: "Dominant Lethal mutations in a mammal. In "Chemical mutagens.: Principles and methods for their detection". A. Hollaender, Ed. Plenum Press. New York 2: 541-568. 1971.
- 3) Bauchinger, M.: "Chromosomen analyse bei verkehrspolizisten mit eritotoler blei last". *Mutations - Res.* 16: 407, 412. 1972.
- 4) Bauchinger M.: "Chromosomen analisen in zellkulturen des chinesischen hamsters. Nach applikation von blei acetat"., *Mutation Res.* 14: 95-100. 1972.
- 5) Beek, B.: "Effect of lead acetate on human leukocyte chromosomes in vitro". *Experientia* 30: 1006-1007. 1974.
- 6) Bonsignore, D.: "L'attivita ale - distratasica - eritrocitaria que le test diagnostico nel Saturnismo professionali". *Med. Lavoro* 56: 199-205. 1965.
- 7) Bravo, A. H.: "La contaminación aérea y su relación con el flujo de vehiculos en la Ciudad de México".- Instituto de Ingenieria. U.N.A.M. Pub. No. 27, Méxi-

co, 1969.

- 8) Browder A.: "The problem of lead poisoning". *Medicine* 52: 121-139. 1973.
- 9) Bruin, A.: "Certain biological effects of lead -- upon the animal organism". *Arch. Environ Health*. 23: 249-264. 1971.
- 10) Chisolm, J.: "Lead poisoning". *Sci Amer.* 224: 15-23. 1971.
- 11) Chisolm, J.: "Disturbance in the biosynthesis of heme in lead intoxication". *J. Ped.* 64: 174-185. - 1964.
- 12) Cochran, W.: *Diseños Experimentales*, Ed. Trillas. 1976.
- 13) D.I.S.P. I.M.S.S.: "Epidemiología del Pb en derecho-habientes del I.M.S.S. en el Valle de México. Reunión Fronteriza Mexicano-Norteamericano de Salud Pública. 1975.
- 14) Dixon, R.: "Possible role of the blood-testicular barrier in dominant lethal testing. " *Environ Health Perspect.* 6: 59-63. 1973.
- 15) Dixon & Massey: "Introducción al análisis estadístico", Ed. Mc. Graw Hill. 1973.
- 16) Epstein, S.: "Recommended procedures for testing genetic hazards from chemicals. Based on the induction of dominant lethal mutations in mammals".

Nature 230: 469-470. 1971.

- 17) Epstein, S.: "Use of the dominant-lethal test to detect genetic activity of environmental chemicals". Environ Health., Perspect. 6: 23-26. 1973.
- 18) Green, S.: "The dominant-lethal test: Potential limitations and statistical considerations for safety evaluation". Environ Health. Perspect. 6: 37-46. 1973.
- 19) Hasan, J.: "Deficient red cell membrane Na. K, ATP, ase in lead poisoning". Arch. Environ Health. 14: 313-317. 1967.
- 20) Kehoe, R.A.: "The metabolism of lead in man in health and disease. Arch. Environ Health. 2: 418-422. 1961.
- 21) Kehoe, R.A.: "The metabolism of lead in man in health and disease." 1 The normal metabolism of lead. J. Roy Inst. Public Health 24: 81-97. 1961.
- 22) Kennedy, T.: "Reproductive performance of young - females mice following vaginal opening." J. Reprod. Fert. 35: 383-387. 1973.
- 23) Koller, P.L.: "Decreased anti body formation in mice exposed to lead". Nature. 250: 148-150. 1974.
- 24) Legator, M.S.: "chemicals mutagens". Annu. Rev. Med. 23: 413-428. 1972.
- 25) Leonard, A.: "Dangers genetiques d'une intoxication

- par le plomb". Annu. Gembloux. 79: 109-119. 1973.
- 26) Lichtman, H.C.: "In vitro pyrrole and porphyrin - synthesis in lead poisoning and iron deficiency". J. Clin. Invest. 42: 830-839. 1963.
 - 27) Marques, M. "Estado actual de la contaminación del aire de la Ciudad de México". Rev. de Salud Pública de México, Vol. II: 199-202. 1969.
 - 28) Muro, L.A.: "Chromosome damage in experimental lead poisoning". Arch. Path. 87: 660-663. 1969
 - 29) Nakaho, K.D.: "Amino levulinic acid dehydratase activity erythrocytes or the evaluation for lead poisoning". Clin Chim. Acta. 19: 319-325. 1968.
 - 30) Niesburg, P.: "Red blood cell D-aminolevulinic acid dehydrase activity". Am. J. Dis Child. 127:348-350 1974.
 - 31) O'Riordan, M.L.: "Absence of significant chromosome damage in males occupationally exposed to lead". - Nature 247: 50-53. 1974.
 - 32) Rausa, G.: "Azione del piombo acetato sulla fosfatasi alcalina serica del ratto". Ig. Mod. 62: 363-372. 1969.
 - 33) Ray, V.: "Some primary considerations in the interpretation of the dominant-lethal assay". Environ Health. Perspect 6: 27-35. 1973.

- 34) Salsburg, D.: "Statistical considerations for dominant lethal mutagenic trials". Environ Health. - Perspect. 6: 51-58. 1973
- 35) Schmid, E.: "Die Cytogenetische Wirkung von Blei in menschlichen peripheren Lymphocyten in vitro und in vivo". Mutations Res. 16: 401-406. 1972.
- 36) Schwanitz, G.: "Chromosomen schaden bei beruflicher Bleibelastung". Dtsch. Med. Wochr. 97: 1636-1641. 1970.
- 37) Tola, S.: "Parameters indicative of absorption and biological effect in new lead exposure a prospective study". Brit., J. Ind. Med. 30: 134-141. 1973.
- 38) Verma, M.: "Mutagenicity and infertility following administration of Lead sub-acetate to Swiss male mice". Experientia 30: 468-487. 1974.