

TENDENCIA DE 1988 A 1998 DE LOS NIVELES DE PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS PERSISTENTES EN TEJIDO ADIPOSO HUMANO EN VERACRUZ, MÉXICO

Stefan M. WALISZEWSKI, Ángel A. AGUIRRE-GUTIÉRREZ y Rosa M. INFANZÓN-RUIZ

Instituto de Medicina Forense, Universidad Veracruzana, SS Juan Pablo II esq. Reyes Heróles, Boca del Río 94290 Veracruz, México, correo electrónico: stefanmw@vice-ver.veracruz.uv.mx

(Recibido noviembre 1998, aceptado septiembre 1999)

Palabras clave: plaguicidas organocolorados, tejido adiposo humano

RESUMEN

En la República Mexicana están permitidos más de 270 ingredientes activos de plaguicidas para usos agrícola, sanitario e industrial. Entre los insecticidas organocolorados, los de mayor importancia por sus propiedades de biomagnificación en la cadena trófica, son el DDT y el Lindano. En el período de 1988 a 1998 se analizaron 326 muestras de tejido adiposo humano. Se observó durante el transcurso del estudio contaminación elevada por DDT y su metabolito DDE, que alcanzó valores máximos de 6.67 mg/kg y 18.91 mg/kg en base lipídica, respectivamente. Esta contaminación puede deberse a la aspiración de los vapores del DDT rociado en el entorno durante el combate sanitario del paludismo y al consumo de alimentos contaminados de origen animal.

ABSTRACT

In México more than 270 active ingredients of pesticides used in agriculture, sanitation and industry are permitted. Among the organochlorine pesticides the most important, due to their properties of biomagnification in the food chain, are DDT and Lindane. From 1988 to 1998 a total of 326 samples of human adipose tissue were analysed. A significant contamination with DDT and its metabolite (DDE) was observed during the study period, reaching the maximum mean values of 6.67 mg/kg and 18.91 mg/kg on fat basis, respectively. This contamination may be caused by the aspiration of DDT vapors used in sanitary actions against malarial and by the consumption of contaminated food of animal origin.

INTRODUCCIÓN

La presencia de residuos agroquímicos en el ambiente se inició al ser incluidos los plaguicidas en forma masiva en monocultivos sembrados en grandes espacios, que necesitan protección constante. Paralelamente, se extendió el programa de erradicación de la malaria y de las enfermedades parasitarias de la piel en áreas tropicales, como Veracruz que representa una zona pantanosa e insalubre. En México todavía este programa se basa en el

uso intenso del DDT y del Lindano. Esta actividad originó residuos de DDT y sus metabolitos y del Lindano y sus isómeros en el ambiente, los alimentos y la población expuesta a sus vapores.

De acuerdo con el Catálogo Oficial de Plaguicidas (CICOPLAFEST 1994) en la República Mexicana están permitidos siete ingredientes activos de insecticidas organocolorados (Clordano, DDT, Dicofol, Dienoclor, Endosulfán, Lindano y Metoxiclor). El DDT y el Lindano son los insecticidas de mayor importancia en este grupo,

siendo utilizados actualmente en forma restringida; el DDT está recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como insecticida de selección en las campañas sanitarias en áreas tropicales para el control de vectores transmisores del paludismo (WHO 1984, 1994, Curtis 1994, Roberts y Andre 1994). El Lindano o γ -hexaclorociclohexano (γ -HCH) es empleado en la agricultura para la protección de los cultivos y de las semillas y para la esterilización del suelo, en la ganadería para la lucha contra los ectoparásitos del ganado y en el Sector Salud en actividades sanitarias contra parásitos de la piel en humanos (Worthing y Hance 1991, CICOPLAFEST 1994). Su actividad tóxica se caracteriza por el daño potencial que puede ocasionar debido a su persistencia y acumulación en la cadena trófica, razón por la cual el DDT y el HCH técnico (por su alto contenido de isómeros α y β -HCH) fueron prohibidos desde principios de la década de años 70 en la agricultura de los países industrializados (IPCS 1979).

En los últimos años, el incremento de ciertas patologías que ya se pueden observar en la población, aunado al gran potencial tóxico de los contaminantes para el ecosistema y en particular para la salud humana, han hecho surgir la necesidad del monitoreo de los niveles de contaminación y de conocer las fuentes y rutas de circulación a través de los componentes biológicos del ambiente. Además de un monitoreo de muestras ambientales y de los alimentos para establecer los niveles de contaminación, se requiere vigilar la acumulación de diversas sustancias tóxicas en los tejidos humanos (Zielhuis 1979) para estimar la exposición humana total proveniente de fuentes externas (ambientales) e internas (alimenticias) (Ott 1985, Lioy 1990). Estas tareas están apoyadas por las investigaciones más recientes que contemplan la selección de la población estudiada y las técnicas para la toma de muestras, el monitoreo de los microambientes, el patrón de monitoreo de la exposición personal, un diseño instrumental, los métodos directos de cuantificación de las sustancias tóxicas y sus metabolitos, el desarrollo y el uso de los marcadores biológicos y el control de calidad y confiabilidad de la calidad metodológica (National Research Council 1991).

El tejido adiposo es un excelente biomarcador en los estudios epidemiológicos de la contaminación alimenticia y ambiental. Por ser un tejido rico en grasa donde se almacenan sustancias lipofílicas, tales como los plaguicidas organoclorados, es el medio más adecuado para los estudios que evalúan el grado de exposición humana a los compuestos químicos persistentes.

Desde 1988 se está realizando en el Instituto de Medicina Forense de la Universidad Veracruzana un estudio de monitoreo permanente para evaluar la fluctuación en el transcurso de los años de los niveles de plaguicidas organoclorados en los habitantes de la zona de Veracruz, con el fin de determinar las posibles fuentes de contaminación (Waliszewski *et al.* 1995). De los plaguicidas

organoclorados a estudiar se seleccionaron el pp'DDT y el op'DDT que constituyen el producto técnico del insecticida utilizado por la Secretaría de Salud en el combate del paludismo y su metabolito pp'DDE; así como el Lindano (γ -HCH) que como ya se mencionó, es utilizado en la agricultura, en la ganadería y por el Sector Salud para la eliminación de parásitos externos en humanos; más sus isómeros α y β -HCH, los que son productos de la biotransformación ambiental del Lindano y del Hexaclorobenceno (HCB) cuya procedencia se deriva de la actividad industrial. Estos agentes se consideran como los de mayor importancia y pueden estar presentes en muestras de tejidos humanos en concentraciones considerables.

METODOLOGÍA

Para evaluar el grado de contaminación humana por residuos de plaguicidas organoclorados persistentes, se tomaron muestras de tejido adiposo de la región abdominal de personas fallecidas en Veracruz durante las necropsias practicadas en el Instituto de Medicina Forense de la Universidad Veracruzana, por orden del Ministerio Público, con el fin de establecer la causa del fallecimiento y en 1997 y 1998 de pacientes durante las intervenciones quirúrgicas de cesárea. En el primer período de estudio de 1988 a 1992, se colectaron un total de 177 muestras: 31 en 1988, 56 en 1991, 90 en 1992, cuyos resultados se presentaron anteriormente (Waliszewski *et al.* 1995) y durante el seguimiento de éste se colectaron en total 149 muestras adicionales: 38 en 1994, 42 en 1995, 34 en 1997 y 35 en 1998.

Las muestras tomadas se guardaron en frascos de cristal de 10 ml, identificadas mediante un número y almacenadas en un congelador a -20°C hasta su análisis. Cada una de las muestras fue acompañada de los siguientes datos: sexo, edad, lugar de residencia y causa del fallecimiento, con el fin de evaluar las posibles relaciones entre estos factores y el nivel de plaguicidas organoclorados encontrado. El análisis se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Waliszewski y Szymczyński (1982). Las determinaciones cualitativa y cuantitativa de los plaguicidas organoclorados se efectuaron por cromatografía de gases en un cromatógrafo Varian Modelo 3300 con detector de captura de electrones con fuente radioactiva ^{63}Ni , conectado a un integrador Varian Modelo 4400. La separación de los plaguicidas se llevó a cabo de acuerdo con el método 608 de la US EPA (US EPA 1982) en una columna cromatográfica capilar SPB-608 de 30 m x 0.53 mm id. y 0.5 μm de película. Para el control de calidad del método analítico se realizó un estudio de adición de una mezcla de estándares de los plaguicidas estudiados en 10 repeticiones que permitió precisar el porcentaje de recuperación

de los plaguicidas, así como la desviación estándar y la varianza de los resultados obtenidos que se presentan en la **tabla I**. En el estudio se utilizó grasa de bovino con un nivel mínimo de contaminación para someter posteriormente los resultados obtenidos a una evaluación estadística. La estimación de los niveles medios para cada muestra analizada por duplicado, se realizó por separado mediante un análisis estadístico descriptivo de los niveles determinados. Las diferencias entre los niveles de plaguicidas en función de los factores de residencia, edad, sexo y causa del fallecimiento, se evaluaron mediante un análisis de varianza univariado ($p > 0.05$) y las diferencias entre las medias de cada grupo se compararon aplicando la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer (Minitab 12).

TABLA I. NIVELES (mg/kg en base lipídica), PORCENTAJE PROMEDIO DE RECUPERACIÓN (\bar{X}) Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DS) DE LOS PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS ADICIONADOS A LA GRASA DE BOVINO

PLAGUICIDA	NIVEL	$\bar{x} \pm DS$
HCB	0.09	97 \pm 2
α -HCH	0.10	98 \pm 4
γ -HCH	0.09	93 \pm 4
β -HCH	0.09	94 \pm 5
pp' DDE	0.19	88 \pm 3
op' DDT	0.37	87 \pm 3
pp' DDT	0.28	88 \pm 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se tomaron y analizaron 149 muestras durante este estudio de seguimiento en los años de 1994 a 1998, cuya procedencia fue la ciudad de Veracruz y la zona suburbana. Para todas ellas se recopilaron los datos referentes al lugar de residencia, sexo y edad. En todas las muestras

de tejido adiposo analizadas se detectó la presencia de pp'DDT y su metabolito pp'DDE, mientras que el isómero op'DDT se encontró en menor proporción. En la **tabla II** el valor máximo anual del insecticida pp'DDT detectado durante el estudio correspondió a 1988, con un valor medio de 6.67 mg/kg (en base lipídica), que desciende gradualmente hasta 1995 y baja significativamente en 1997 alcanzando el valor medio de 0.68 mg/kg (en base lipídica). Ello indica una disminución de la exposición de la población al DDT utilizado en el combate sanitario de los vectores del paludismo, debido a la sustitución del DDT por otros insecticidas recomendados para la actividad sanitaria como Malatión, Temefós y piretroides. De acuerdo con el Tratado de Libre Comercio entre México y los Estados Unidos de América, se realiza un programa de sustitución gradual del DDT utilizado en las campañas sanitarias por insecticidas organofosforados y especialmente por piretroides. Estos revelan gran actividad insecticida con limitada toxicidad a los mamíferos, sin presentar el fenómeno de bioacumulación, lo que los favorece como agentes idóneos para el combate sanitario de vectores. Al mismo tiempo se puede observar una disminución significativa ($p < 0.05$) del nivel del op'DDT cuyo valor de 1.79 mg/kg (en base lipídica) determinado en 1988 descendió en 1998 hasta 0.07 mg/kg (en base lipídica). Con respecto a los niveles del pp'DDE, metabolito del pp'DDT, se presentó un ascenso de los niveles en 1992 alcanzando un valor medio de 18.91 mg/kg (en base lipídica), el cual descendió hasta 4.47 mg/kg (en base lipídica) en 1994 y nuevamente ascendió hasta 9.43 mg/kg (en base lipídica) en 1995. En 1997 y 1998 los niveles promedio del pp'DDE fluctuaron entre 4.30 y 4.82 mg/kg siendo comparables con los de 1994. La presencia del pp'DDE en el tejido adiposo humano indica dos fuentes probables de contaminación: la aspiración de los vapores del DDT rociado en el entorno y su metabolización posterior y la acumulación del pp'DDE derivado de la ingesta de alimentos contaminados de origen animal, en los cuales el DDT fue metabolizado

TABLA II. CONCENTRACIÓN MEDIA (mg/kg en base lipídica) DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS EN TEJIDO ADIPOSEO DE LOS HABITANTES DE VERACRUZ

PLAGUICIDA	1988 (n=31)	1991 (n=56)	1992 (n=90)	1994 (n=38)	1995 (n=42)	1997 (n=34)	1998 (n=35)
HCB	0.03	0.03	0.02	0.04	0.08	0.07	0.06
α -HCH	0.08	0.05	0.12	0.01	0.05	0.01	0.01
β -HCH	0.58	0.27	0.30	0.37	0.67	0.18	0.21
γ -HCH	0.11	0.06	0.25	0.01	0.10	0.02	0.01
Σ -HCH	0.77	0.38	0.67	0.39	0.82	0.20	0.22
pp' DDE	9.97	10.00	18.91	4.47	9.43	4.30	4.82
op' DDT	1.79	1.35	1.19	0.44	0.21	0.06	0.07
pp' DDT	6.67	4.02	4.72	4.53	3.88	0.68	1.01
Σ -DDT	17.45	14.06	24.82	9.41	13.66	5.06	5.92
pp' DDE/pp' DDT	1.49	2.48	4.00	0.98	2.43	6.32	4.77

TABLA III. NIVELES MEDIOS (mg/kg en base lipídica) DE DDT TOTAL EN TEJIDO ADIPOSO DE LOS HABITANTES DE VERACRUZ

ORIGEN	1988	1991	1992	1994	1995	1997	1998
SUBURBANO	38.05*	28.61*	38.55*	18.42*	23.23*	5.94	7.04
URBANO	8.53	16.80	18.77	6.02	4.08	4.06	3.77
S / U	4.46	1.70	2.05	3.06	5.69	1.46	1.86

* Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

previamente a DDE. Esto comprueba, que la fluctuación observada en los niveles de pp'DDE puede deberse a la fuente adicional de contaminación que son los alimentos. Un análisis del cociente pp'DDE/pp'DDT indica su nivel medio máximo en 1997 con un valor de 6.32. Estos cocientes establecen una permanencia del pp'DDE como depósito en el tejido adiposo humano y una contaminación de la población a través de los alimentos, ya que al mismo tiempo en el transcurso de los años se observa una disminución del nivel del pp'DDT.

entre la zona de Veracruz y la suburbana se nivela alcanzando niveles comparables y estadísticamente no significativos. Este fenómeno se debe a la sustitución del DDT por otros insecticidas menos persistentes utilizados en ambas zonas para el combate sanitario de los vectores del paludismo.

Para la evaluación de los resultados (correspondientes al muestreo post-mortem de 1988 a 1995) del DDT total en función de la causa del fallecimiento se integraron los grupos denominados cardiovascular y otras patologías como

TABLA IV. NIVELES MEDIOS (mg/kg en base lipídica) DE DDT TOTAL EN TEJIDO ADIPOSO DE LOS HABITANTES DE VERACRUZ CALCULADOS DE ACUERDO CON LA CAUSA DEL FALLECIMIENTO

CAUSA	1988	1991	1992	1994	1995
CARDIOVASCULAR	84.34	25.65	51.35	39.76	47.01
OTRAS PATOLOGÍAS	22.15	8.94	8.94	8.54	12.72

En la **tabla III** se puede observar una fluctuación de los valores medios del DDT total, constituido por la sumatoria de pp'DDT + op'DDT + pp'DDE en el tejido adiposo de las personas procedentes de la zona suburbana y de la ciudad de Veracruz. Los valores indican y comprueban una mayor exposición de la población procedente de la zona suburbana. El cociente de los valores medios de DDT total de la zona suburbana / urbana muestra una disminución en 1991 y un ascenso constante observado hasta 1995, cuyo valor de 5.69 superó su máximo anterior en 1988. Ello revela una exposición significativa de la población suburbana de Veracruz al DDT y su metabolito DDE, cuya fuente de procedencia se supone sean las actividades sanitarias y los alimentos contaminados. Durante 1997 y 1998 la diferencia observada muy significativa

se aprecia en la **tabla IV**. De acuerdo con el análisis de varianza los valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) corresponden a los individuos con padecimientos cardiovasculares. Ello concuerda con estudios anteriores (Szymczynski y Waliszewski 1986) sobre el depósito mayor de DDT total en tejido adiposo de pacientes con padecimientos cardiovasculares, originado por un cambio en el balance de lípidos saturados y no saturados en el organismo característico de este tipo de enfermedades (Muñoz Cano 1992). Los resultados de otras patologías como cirrosis hepática, tuberculosis, padecimientos cancerígenos y hemorragias internas, en general oscilan alrededor de los valores promedio detectados en el año.

Los valores medios del DDT total calculados en función de la edad, que se presentan en la **tabla V**, indican

TABLA V. NIVELES MEDIOS (mg/kg en base lipídica) DE DDT TOTAL EN TEJIDO ADIPOSO DE LOS HABITANTES DE VERACRUZ CALCULADOS DE ACUERDO A LA EDAD

EDAD (años)	1988	1991	1992	1994	1995
0 - 20	17.36	4.31	22.54	18.21	6.27
21 - 50	8.92	11.48	21.30	32.76	11.72
más de 50	56.04	22.50	31.98	68.23	36.28

TABLA VI. NIVELES MEDIOS (mg/kg en base lipídica) DE DDT TOTAL EN TEJIDO ADIPOSEO DE LOS HABITANTES DE VERACRUZ CALCULADOS DE ACUERDO CON EL SEXO

SEXO	1988	1991	1992	1994	1995
FEMENINO	10.36	7.12	22.87	8.93	12.89
MASCULINO	14.35	15.39	24.63	10.27	15.01

una tendencia de acumulación mayor del DDT en el tejido adiposo humano con la edad, lo que concuerda con los resultados de estudios de Camps *et al.* (1989), Mes (1990), Ferrer *et al.* (1992), Gómez-Catalán *et al.* (1993), Tanabe *et al.* (1993), Duarte-Davidson *et al.* (1994) y Ludwicki y Góralczyk (1994).

Los niveles del DDT evaluado en función del sexo, presentes en la **tabla VI**, indican mayor contaminación en el sexo masculino. Estos datos concuerdan con los estudios de Brook (1971) y Pittel *et al.* (1979), quienes señalan que el tejido adiposo del sexo masculino tiene una concentración mayor de ácidos grasos saturados, por lo que su capacidad de acumulación de los plaguicidas organoclorados persistentes es más elevada.

Durante el estudio, las concentraciones de β -HCH y γ -HCH, así como de α -HCH y HCB permanecieron en niveles bajos, comparables con los determinados en otros países. En cuanto al isómero β -HCH, que presenta mayor lipofilia y persistencia en el ambiente, su nivel no varió significativamente ($p > 0.05$).

CONCLUSIONES

Se debe señalar que existe una contaminación significativa de la población veracruzana por DDT y su metabolito DDE, que se debe a su uso en el combate sanitario contra los vectores del paludismo. En 1997 y 1998 se observa una menor contaminación por el DDT debido a su sustitución gradual por otros insecticidas menos persistentes. El ascenso del nivel de DDE en 1992 y 1995, observado en el tejido adiposo, es probablemente causado por el consumo de alimentos contaminados por DDE.

Esta situación indica la necesidad de que las autoridades correspondientes realicen el monitoreo continuo de los alimentos comercializados en el país, ya que ellos constituyen una fuente importante de exposición de la población a este tipo de sustancias tóxicas. Durante el transcurso del estudio, el nivel de DDT utilizado en las campañas sanitarias disminuyó, lo que resalta la importancia de las conclusiones sobre el nivel de la contaminación humana de origen alimenticia observada en este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al apoyo económico del

CONACyT, Proyectos: D113-903511 y 4238-PM

REFERENCIAS

- Brook C.G.D. (1971). Composition of human adipose tissue from deep and subcutaneous sites. *Br. J. Nutr.* *25*, 377-380.
- Camps M., Planas J., Gómez-Catalán J., Sabroso M., To-Figueras J. y Corbella L. (1989). Organochlorine residues in human adipose tissue in Spain: study of an agrarian area. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *42*, 195-201.
- CICOPLAFEST (1994). *Catálogo Oficial de Plaguicidas*. México D.F.
- Curtis C.F. (1994). Should DDT continue to be recommended for malaria vector control? *Med. Vet. Entomol.* *8*, 107-112.
- Duarte-Davidson R., Wilson S.C. y Jones K.C. (1994). PCBs and other organochlorines in human tissue samples from the Welsh population: I-Adipose. *Environ. Pollut.* *84*, 69-77.
- Ferrer A., Bona M.A., Castellano M., To-Figueras J. y Brunet M. (1992). Organochlorine residues in human adipose tissue of the population of Zaragoza (Spain). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *48*, 561-566.
- Gómez-Catalán J., Planas J., To-Figueras J., Camps M. y Corbella J. (1993). Organochlorine pesticide residues in the population of Catalonia (Spain). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *51*, 160-164.
- IPCS (1989). DDT and its derivatives - environmental aspects. *Environ. Health Criteria* 83. WHO, Geneva.
- Lioy P.J. (1990). Assessing total human exposure to contaminants. A multidisciplinary approach. *Environ. Sci. Technol.* *24*, 938-945.
- Ludwicki J.K. y Góralczyk K. (1994). Organochlorine pesticides and PCBs in human adipose tissue in Poland. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *52*, 400-403.
- Mes J. (1990). Trends in the levels of some chlorinated hydrocarbons residues in adipose tissue of Canadians. *Environ. Pollut.* *65*, 269-278.
- Muñoz Cano J.M. (1992). Dieta y arteriosclerosis. *Ciencias de la Salud* *32*, 23-26.
- National Research Council (1991). *Environmental Epidemiology: Public Health and Hazardous Wastes*. National Academy Press, Washington.
- Ott W.R. (1985). Total human exposure. *Environ. Sci. Technol.* *19*, 880-886.
- Pittel P.G., Halliday D. y Bateman P.E. (1979). Site differences in the fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue of obese women. *Br. J. Nutr.* *42*, 56-61.
- Roberts D.R. y Andre R.G. (1994). Insecticide resistance issues in vector-borne disease control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *50*, 21-34.

- Szymczynski G.A. y Waliszewski S.M. (1986). High level of chlorinated pesticide residues in adipose tissue of patients with cardiovascular disorder. The Sixth International Congress of Pesticide Chemistry. Ottawa, Ontario, Canada, August 10-17, 8A/7E-01.
- Tanabe S., Falandysz J., Higaki T., Kannan K. y Tatsukawa R. (1993). Polychlorinated biphenyl and organochlorine insecticide residues in human adipose tissue in Poland. *Environ. Pollut.* 79, 45-49.
- US EPA (1982). Environmental Chemistry Section. Environmental Monitoring and Support Laboratory. Method 608, pp. 73-83.
- Waliszewski S.M. y Szymczynski G.A. (1982). Simple, low cost method for determination of selected chlorinated pesticides in fat samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65, 677-679.
- Waliszewski S.M., Pardío Sedas V.T., Chantiri Pérez J.N., Infanzón Ruiz R.M. y Rivera J. (1995). Evaluación de los niveles de DDT y HCH en el tejido adiposo de algunas personas fallecidas en el estado de Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 11, 87-93.
- WHO (1984). Chemical methods for the control of arthropod vectors and pests of public health importance. World Health Organization, Ginebra.
- WHO (1994). Use of DDT in vector control: conclusions of study group on vector control for malaria and other mosquito-borne diseases. *Med. Vet. Entomol.* 8, 113.
- Worthing Ch.R. y Hance R.J. (1991). *The Pesticide Manual. A World Compendium*. 9ª. ed. The British Crop Protection Council, Surrey, Gran Bretaña.
- Zielhuis R.L. (1979). General aspects of biological monitoring. En: *The Use of Biological Specimens for the Assessment of Human Exposure to Environmental Pollutants* (Berlin A., Wolff A.H. y Hasegawa Y. Eds.) Martinus Nijhoff Publishers, La Haya, pp. 341-359.