

*El lactato como posible factor del mecanismo de fatiga muscular*José Carlos Giraldo T., M.D.¹, María Elena Sánchez, Ph.D.²**RESUMEN**

Se revisa el papel del lactato en la función muscular. Se destacan los siguientes conceptos: el lactato es un intermediario metabólico que aumenta durante el ejercicio de alta intensidad, como consecuencia de la elevada actividad glicolítica. En esas condiciones la formación de ATP se asocia con generación de iones lactato e H^+ y se reduce el pH de la célula activa. Si hay fatiga, el aumento en los niveles de lactato se correlaciona con la magnitud en la caída de la fuerza y los niveles de lactato alcanzados a un determinado nivel de actividad dependen del tipo de la fibra muscular. La salida de lactato de la fibra ocurre principalmente por 3 mecanismos de los cuales el más importante es el cotransporte acoplado de lactato- H^+ , cuya actividad depende del tipo de fibra y del patrón de activación así como del pH y de la concentración del amortiguador (buffer) externos. De los varios factores responsables de la fatiga muscular, la disminución de pH se ha señalado como uno de los más importantes. No obstante, a pesar de la relación entre fatiga muscular y disminución de pH_i , ésta no parece ser suficiente para explicar el grado de reducción de la fuerza durante la fatiga. Recientemente se han realizado experimentos que muestran un efecto inhibitor del lactato sobre el canal de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, lo que sugiere fuertemente que el lactato per se, y no necesariamente el cambio de pH_i asociado, puede jugar un papel importante en el mecanismo de la fatiga. Por otra parte, el lactato podría tener efecto benéfico en la recuperación de la fuerza tetánica y de la capacidad de mantener la fase de meseta durante el tétanos, que se reducen por efecto de la fatiga. Asimismo, el aumento de lactato podría jugar un papel protector de la fibra durante la fatiga, mediante la activación de los canales de K^+ sensibles a ATP. El músculo produce y consume lactato y al aumentar sus niveles en la sangre, los músculos inactivos y también otros tejidos, pueden capturar y utilizar este ion.

Palabras claves: Músculo. Fuerza. Fatiga. Lactato. pH. Canal de liberación de Ca^{++} .

GENERALIDADES

En los músculos de los mamíferos hay diferentes tipos de fibras y por lo menos 3 de ellos hacen parte de los músculos esqueléticos del hombre. Con base en propiedades metabólicas y funcionales, se les ha clasificado como fibras glicolíticas rápidas (GR), glicolíticas-oxidativas rápidas (GOR) y oxidativas lentas (OL). Las dos primeras son de contracción rápida y de gran actividad ATPásica del retículo sarcoplásmico (RS) y miofibrilar. Las OL poseen baja actividad ATPásica

(de RS y miofibrilar), así como una duración prolongada de la sacudida simple (SS) y una velocidad máxima de acortamiento baja en comparación con la de las GR y GOR¹.

Cada tipo de fibra contiene una isozima específica de la proteína contráctil miosina. Con frecuencia las fibras se identifican con base en la actividad ATPásica de la miosina, determinada histoquímicamente como tipos I, IIa y IIb. Hace poco se identificó en el músculo esquelético del adulto un cuarto tipo de fibra que contiene una isozima específica de la miosina, identificada como IIx

o II^{d2}. Otra propiedad por la que se puede caracterizar el tipo de fibra es su contenido de enzimas mitocondriales: las GOR y las OL poseen un alto contenido mitocondrial y son más resistentes a la fatiga que las fibras GR; así por ejemplo, el sóleo y la región profunda del gastrocnemio contienen principalmente fibras OL y GOR respectivamente y son más resistentes a la fatiga que las regiones musculares que contienen sobre todo fibras tipo GR. Estas últimas predominan en músculos rápidos, que se fatigan más pronto. Se ha visto en seres humanos que después de ejercicios hasta el agotamiento, donde se emplean contracciones dinámicas y estáticas, estas fibras tipo II contenían niveles de lactato más

1. Estudiante Magister en Fisiología, Universidad del Valle, Cali. Profesor Asistente, Programa Ciencias del Deporte y la Recreación, Facultad de Medicina, Universidad Tecnológica de Pereira.
2. Profesora Asociada, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.

altos (25-27 mM) que las fibras lentas tipo I (15.8 mM)³. Además, se señaló que independientemente de si la fatiga muscular se produce por estimulación *in vitro* o *in situ* de un músculo aislado o por ejercicio *in vivo* (si este ejercicio requiere alta tasa glicolítica), la magnitud de caída en la fuerza está muy correlacionada con el aumento en el lactato muscular¹.

El músculo esquelético produce y retira lactato al mismo tiempo. La liberación de lactato de un músculo que se contrae se puede cambiar a captura neta, si aumenta la concentración de lactato arterial. Además, un nivel aumentado de lactato en la sangre, causará también una elevada captura por los músculos inactivos⁴.

Los músculos esqueléticos poseen en la membrana plasmática un sistema de cotransporte lactato-H⁺. En el músculo esquelético la distribución de la capacidad de transporte de lactato-protón depende del tipo de fibra, con una capacidad más alta en las de contracción lenta que en las rápidas⁴. Durante una actividad muscular intensa y en el período de recuperación, el eflujo o salida de lactato e H⁺ están mediados sobre todo por el transportador lactato-protón, lo que reduce la acumulación de lactato en el músculo y la caída del pH interno. Se ha sugerido que este proceso está comprometido en la fatiga muscular. También se ha planteado que la capacidad del transportador lactato-protón se puede aumentar por entrenamiento intenso y reducirse por inactividad, es decir, que este sistema de transporte puede sufrir cambios adaptativos⁴.

INFLUENCIA DEL LACTATO SOBRE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR

Debido a su masa el músculo

esquelético tiene papel fundamental en la regulación del lactato como principal productor y consumidor de éste en el cuerpo. Durante el ejercicio intenso, el metabolismo se activa rápidamente, y lleva a un aumento en la producción de fosfatos de alta energía, necesarios en el mantenimiento de la contracción máxima. Durante la formación de ATP en ejercicio se generan iones lactato (Lac) e hidrogeniones (H⁺), lo que reduce el pH dentro de la célula activa. Como ya se mencionó, el lactato se cita con frecuencia como un producto metabólico que contribuye a reducciones en la fuerza desarrollada durante el ejercicio de alta intensidad. Su concentración se sabe tan alta como 20-25 mM en el músculo esquelético durante ejercicios de alta intensidad en seres humanos⁵; no obstante, también se conocen concentraciones de 45-50 mM⁴. Aunque son varios los factores considerados responsables de la fatiga muscular, quizá la disminución del pH durante y después de la actividad física, se ha señalado como el más importante. Es de anotar que, a pesar de la asociación entre disminución de pH y fatiga muscular, no hay consenso sobre la relación de causalidad entre pH disminuido y fatiga⁵. Favero *et al.*⁶ demostraron que el lactato por sí mismo modificó la función del canal liberador de calcio del RS: en presencia de lactato 20mM, la velocidad de liberación de calcio se inhibió en 30% y este efecto fue consistente aun en presencia de distintos agentes usados para estimular la liberación de calcio (peróxido de hidrógeno, cloruro de plata y doxonrubicina, entre otros). La inhibición de la actividad del canal de calcio del RS por el lactato se reflejó además en su habilidad para inhibir la unión de la rianodina marcada al canal liberador. Esta unión se inhibió por un aumento en

la concentración de lactato, tanto a pH 7.1 como a pH 6.5, lo que sugiere que el lactato *per se* y no necesariamente el cambio asociado de pH, puede actuar directamente sobre el canal liberador. La inhibición de aproximadamente 30% de la unión de rianodina fue paralela a la reducción en la velocidad de liberación de calcio. En este estudio los autores encontraron además una reducción significativa en el número de sitios de unión de rianodina marcada (lo que significa una disminución en el número de canales activos) sin alteración en la afinidad de la unión de esta última por su receptor. En experimentos hechos en vesículas de RS fusionadas a bicapas lipídicas se vio que el lactato disminuyó la liberación de calcio por un efecto sobre la probabilidad de apertura del canal sin afectar la conductancia del mismo. Estos experimentos representan las primeras medidas directas indicadoras de que el aumento en la concentración de lactato inhibe el proceso liberador de calcio. Además, cuando activadores conocidos estimulan el canal, la presencia del lactato cierra el canal liberador de calcio e inhibe también la unión de rianodina marcada.

En otro estudio Favero *et al.*⁷ demostraron que la inhibición por parte del lactato (10-30 mM) de la activación producida por cafeína en el canal de calcio, provee evidencia precisa que el efecto del lactato se producía en el canal liberador en RS y puede ser relevante para el proceso de fatiga muscular durante las condiciones en que están presentes concentraciones altas de lactato en el músculo activo. Además, se sabe que el lactato inhibe la liberación de calcio inducida por un variado grupo de activadores, esto sugiere fuertemente que ellos interactúan en diversos sitios del canal liberador de calcio del RS y que el sitio al que

se une el lactato es crítico para la función normal. La inhibición por lactato de la actividad del canal de calcio activado por calcio, reduciría la cantidad de calcio liberado después de la activación muscular normal. Aunque las alteraciones en el proceso acople E-C y la inhibición del mecanismo liberador de calcio del RS pueden no justificar completamente la disminución de la tensión observada durante la activación muscular continua, los cambios consiguientes en las transitorias de calcio pueden contribuir apreciablemente a la fatiga muscular.

Mecanismos del eflujo de lactato.

En los experimentos de Mainwood y Worsley-Brown⁸ se demostró que la velocidad de salida del lactato depende tanto del pH externo como de la concentración del amortiguador externo. La velocidad de salida se redujo cuando la concentración del amortiguador disminuyó a un pH constante o cuando el pH se redujo a una concentración constante de amortiguador. La salida reducida de lactato y de H⁺ previno la recuperación de la tensión y adicionalmente, a bajas concentraciones del amortiguador (10mM), la salida del lactato y de los H⁺ se desacopla y provocan así un exceso en la salida del lactato si se compara con la observada para los H⁺.

El pH externo puede afectar la capacidad funcional del músculo esquelético. Se ha visto que los músculos bañados en soluciones con bastante bicarbonato funcionan mucho mejor que los sometidos a bajas concentraciones. Con concentraciones de bicarbonato de aproximadamente 25 mEq/l, es menor el aumento en los tiempos de relajación provocados por fatigas después de un tétanos y la recuperación de la fuerza es más rápida que en los músculos que se incuban en concentraciones bajas (1 mEq/l)^{9,10}. Una

recuperación más rápida de la fuerza con bicarbonato alto se asoció con una salida más rápida de lactato, lo que no afectó la disminución de la fuerza durante la fatiga; la disminución de la fuerza a bajas concentraciones de bicarbonato depende de la duración e intensidad del ejercicio. Si el ejercicio es corto y de alta intensidad, un amortiguador extracelular reducido no tiene ningún efecto; no obstante, en ejercicios de alta resistencia en seres humanos, se observa un aumento en la fatigabilidad. Durante la recuperación, la velocidad de salida de lactato en músculos sometidos a soluciones de baja concentración de bicarbonato (1 mM) fue menor que la de los incubados en alto bicarbonato (25 mM). Como el pK del sistema lactato-ácido láctico es alrededor de 3.7, sólo 0.05% del lactato intracelular puede estar en la forma no disociada en el estado de reposo⁹.

Lo anterior sugiere que el lactato no sale sólo como ácido no disociado; según Mainwood *et al.*¹¹ la salida de lactato ocurre principalmente por 3 mecanismos:

1. Difusión como ácido no disociado (aunque se debe tener presente que a pH fisiológico el ácido producido se disocia en lactato e H⁺).
2. Difusión de ion lactato.
3. Vía un cotransporte acoplado lactato-H⁺.

El hallazgo de mayores niveles de lactato asociado con reducciones asociadas de ATP y CP en músculos de animales de control que en los de animales entrenados, sugiere que los primeros dependen más de la glicólisis y menos del metabolismo oxidativo¹². Los niveles menores de lactato en músculos entrenados además se podrían deber en parte a un aumento en la remoción por difusión o intercambio y/o por metabolismo oxidativo. A pH

fisiológico, los iones H⁺ se forman en cantidades equimolares a las de lactato, y entonces no es de sorprender la observación de Troup *et al.*¹² de una elevada relación inversa entre lactato tisular y pH intracelular (pHi).

Relación entre lactato muscular y pH celular. Un aumento en el ion H⁺ intracelular se ha vinculado a la fatiga vía diversos mecanismos, que incluyen inhibición competitiva de unión del Ca⁺⁺ a la troponina (Tn), lo que produce tensión reducida, inhibición de la glicólisis, disturbio en el proceso de captación de Ca⁺⁺ del RS y una inhibición directa del puente cruzado y la ATPasa miofibrilar^{1,13-15}. Asimismo, se ha sugerido que el bajo pHi daría cuenta del aumento en los tiempos de relajación vistos durante la fatiga al provocar una reducción de la velocidad de desunión de los puentes cruzados¹⁶. Con la fatiga la osmolaridad del músculo tiende a aumentar y a causar aumento del agua intracelular y edema celular (Borrero LM, González-Serratos, comunicación personal). El aumento en el lactato durante el ejercicio podría dar cuenta de parte del efecto osmótico que lleva a hinchamiento celular y, por tanto, a aumentar el espaciamiento lateral del enmallado muscular, lo que podría llevar a disminuciones de la fuerza; este efecto probablemente sea pequeño. No obstante, en estudios donde se provocó una disminución del diámetro de la célula mediante el uso de dextrán, que disminuye la sección transversal de la fibra, sólo se observó un pequeño aumento en la tensión con respecto al control¹⁷.

El alto lactato muscular podría aumentar la fuerza iónica significativamente, lo que a su vez podría disminuir la fuerza pico. Sin embargo, las observaciones de Chase y Kushmerick¹⁸ de que el lactato 50mM no tuvo ningún efecto

sobre la tensión control de fibras aisladas del psoas de conejo, provee una evidencia directa que los iones lactato no inducen directamente fatiga. Sahlin *et al.*^{19,20} encontraron alta correlación entre la caída del pH muscular y el aumento del contenido de lactato y piruvato después de ejercicio dinámico en seres humanos. Se conoce en la actualidad una correlación inversa entre lactato y fuerza, que es en gran parte dependiente de la alta correlación entre lactato e H⁺ libres; además y aunque en 1994 Fitts mencionó que el agente depresor de la fuerza es el H⁺ y no el lactato, los experimentos de Favero *et al.*⁶⁷ dejan abierta la posibilidad para una participación del lactato como uno de los posibles factores implicados en el mecanismo de fatiga, si se tiene en cuenta que el lactato reduce la liberación de Ca⁺⁺ del RS. Asimismo, Boska *et al.*²¹ hacen referencia a estudios que sugieren que la reducción del pH no es suficiente para explicar el grado de reducción de la fuerza durante la fatiga. Los efectos *per se* del lactato sobre el desarrollo de fuerza parecen difíciles de evaluar, pues la incubación con éste podría influir los niveles de Ca⁺⁺ y pH. No obstante, se pueden hacer algunas inferencias si se tiene en cuenta que los iones lactato *per se* pueden inhibir el canal de Ca⁺⁺ del RS. Al apoyarse en informes de la existencia de canales de K⁺ sensibles a ATP en el músculo esquelético, Juel⁴ sugiere que como estos canales se pueden abrir en presencia de lactato y a bajos valores de pH, podrían jugar algún papel en la fatiga muscular, pues durante ésta se aumentan las concentraciones de lactato y de H⁺; además, menciona que se podría especular que la apertura de estos canales se puede considerar como un mecanismo protector, pues la acumulación de K⁺ extracelular despolarizaría las

células musculares, de tal manera que se deprimiría el desarrollo de fuerza y el daño posterior por disminución de ATP, sería prevenible. Sin embargo, señala que se requieren más experimentos para dilucidar la importancia fisiológica de tal mecanismo.

Según Renaud²² el lactato aumenta la fuerza tetánica durante la fase temprana de la recuperación de músculos sartorios de rana, después de fatiga por tétanos. Este efecto fue especialmente marcado a pH 6.4. Asimismo, a bajo pH el lactato presenta un efecto benéfico con respecto a la recuperación de la capacidad de mantener la fase de meseta durante el tétanos, que se reduce por efecto de la fatiga. Sin embargo, se debe tener presente que Renaud considera que una dependencia de la recuperación de la fuerza tetánica con respecto del pH no se puede excluir completamente debido a un posible efecto del lactato que contrarreste el bajo pH.

Es importante considerar el efecto del pH sobre la actividad de la fosfofructoquinasa; un bajo pH disminuye la actividad de la enzima y según el grado de acidez, podría llegar a bloquear la actividad glicolítica.

Lactato en sangre y músculo: capacidad de trabajo. Después de un ejercicio máximo de corta duración y con cargas de trabajo de 50% a 60% del VO₂ máximo, el lactato en la sangre aumenta y en general promedia los 10-20mM. Después de un ejercicio máximo intermitente se observan mayores niveles sanguíneos de lactato que con ejercicio continuo, y los valores más altos de lactacidemia se asocian con protocolos de ejercicio que comprometen una gran masa muscular²³. Osnes y Hermansen²⁴ han observado niveles de lactato de hasta 32mM después de ciclos intermitentes de ejercicio máximo de 40-60 seg. La concen-

tración máxima de lactato muscular es aproximadamente 10mM mayor que la de lactato en sangre y pueden ocurrir aumentos significativos dentro de los 10 seg de la iniciación del ejercicio "supramáximo."

Al aumentar los niveles de lactato en la sangre, los músculos inactivos aumentan su captura y el lactato capturado se puede usar en la gluconeogénesis sobre todo en fibras rápidas, que son capaces de convertir lactato a glucógeno 3 a 4 veces más rápido que las fibras lentas. Además, pequeñas cantidades de lactato se pueden convertir a maleato o alanina, o el lactato se puede oxidar. Una fracción variable del carbohidrato que se utiliza durante ejercicio moderado, entra al lactato disponible circulante antes de completa oxidación y en un músculo dado, el lactato que se forma en las células glicolíticas, se puede usar como una fuente de energía para fibras más oxidativas. Los sitios de oxidación incluyen no sólo las fibras vecinas, sino también fibras anatómicamente remotas, como también el corazón, el hígado, y otros tejidos. En el hígado el lactato se puede convertir en glucosa. Esta glucosa puede retornar al músculo y ser utilizada por éste como fuente de energía que prolonga la glucólisis muscular (ciclo de Cori). El lactato entonces funciona como un intermediario metabólico importante que puede rápidamente intercambiarse entre compartimentos musculares y entre diferentes tejidos⁴.

SUMMARY

The role of lactate ion on muscle operation is reviewed. The following concepts are outstanding: lactate is a metabolic intermediary that accumulates during high intensity exercise as a result of the associated increase in glycolytic activity. Under those conditions the formation of

ATP is linked to the generation of lactate and H⁺ ions and to the corresponding lowering of the intracellular pH (pHi). If fatigue develops, the increased levels of lactate correlate with the reduction of force and the lactate concentrations reached for a certain degree of activity depend upon the type of muscle fiber involved. Exit of lactate from the fiber occurs mostly by 3 mechanisms, the most important of which is the coupled lactate-H⁺ cotransport, whose activity varies with the type of fiber, activation pattern as well as with the extracellular pH and buffer concentration. The lowering of pHi has been pointed out as one of the more important factors for the production of fatigue. Despite this, the reduction of force attributable to acidification seems insufficient to account for the whole of fatigue. Recent experiments show an inhibitor action of lactate on the sarcoplasmic reticulum calcium release channel, which suggests that lactate *per se* (and not necessarily the associated pHi change) may play an important role in the cause of fatigue. On the other hand, lactate may have a beneficial effect on the recovery of tetanic force and of the ability to maintain the plateau in tetanic contraction. The increase in lactate could also have a protective action on the muscle fiber during fatigue through the activation of ATP-dependent K⁺ channels. Muscle produces and removes lactate, so that when the blood concentrations of the ion increases, it may be captured and utilized by inactive muscles, as well as by other tissues.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su gratitud al Dr. Luis María Borrero, por sus valiosas sugerencias en relación con este manuscrito.

REFERENCIAS

1. Fitts RH. Cellular mechanism of muscle fatigue. *Physiol Rev* 1994; 74: 49-94.
2. Bottinelli R, Schiaffino S, Reggiani C. Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibers from rat skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 1991; 437: 655-72.
3. Thorstensson A, Karlsson J. Fatigability and fiber composition of human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1976; 98: 318-22.
4. Juel C. Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev* 1997; 77: 321-58.
5. Hermansen L, Stensvold I. Production and removal of lactate during exercise in man. *Acta Physiol Scand* 1972; 86: 191-201.
6. Favero TG, Zable AC, Bowman MB, Thompson A, Abramson JJ. Metabolic and products inhibit sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and [³H] ryanodine binding. *J Appl Physiol* 1995; 78: 1665-72.
7. Favero TG, Zable AC, Colter JJ, Abramson JJ. Lactate inhibits Ca²⁺-activated Ca²⁺-channel activity from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Appl Physiol* 1997; 82: 447-52.
8. Mainwood GW, Worsley-Brown P. The effects of extracellular pH and buffer concentration on the efflux of lactate from frog sartorius muscle. *J Physiol (Lond)* 1975; 250: 1-22.
9. Mainwood GW, Worsley-Brown P, Paterson RA. The metabolic changes in frog sartorius muscles during recovery from fatigue at different external bicarbonate concentrations. *Can J Physiol Pharmacol* 1972; 50: 143-55.
10. Mainwood GW, Cechetto D. The effect of bicarbonate concentration on fatigue and recovery in isolated rat diaphragm muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1980; 58: 624-32.
11. Mainwood GW, Renaud JM, Mason MJ. The pH dependence of the contractile response of fatigued skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1987; 65: 648-58.
12. Troup JP, Metzger JM, Fitts RH. Effect of high-intensity exercise training on functional capacity of limb skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1986; 60: 1743-51.
13. Westerblad H, Allen DG. The contribution of [Ca²⁺]_i to the slowing of relaxation in fatigued single fibres from mouse skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 1993; 468: 729-40.
14. Donalson, SKB, Hermansen L. Differential, direct effects of H⁺ on Ca²⁺ activated force of skinned fibers from the soleus, cardiac and adductor magnus muscles of rabbits. *Pflügers Archiv* 1978; 376: 55-65.
15. Fabiato A, Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 1978; 276: 233-55.
16. Westerblad H, Allen DG. The influence of intracellular pH on contraction, relaxation and [Ca]_i in intact single fibers from mouse muscle. *J Physiol (Lond)* 1993; 466: 611-28.
17. Metzger JM, Moss RL. Shortening velocity in skinned single muscle fibers. *Biophys J* 1987; 52: 127-31.
18. Chase PB, Kushmerick MJ. Effects of pH on contraction of rabbit fast and slow skeletal muscle fibers. *Biophys J* 1988; 53: 935-46.
19. Sahlin K, Alverstrand A, Brandt R, Hultman E. Intracellular pH and bicarbonate concentration in human muscle during recovery from exercise. *J Appl Physiol* 1978; 45: 474-80.
20. Sahlin K, Harris RC, Ny Lind B, Hultman E. Lactate content and pH in muscle samples obtained after dynamic exercise. *Pflüegers Arch* 1976; 367: 143-49.
21. Boska MD, Moussavi RS, Carson PJ, Weiner MW, Miller RG. The metabolic basis of recovery after fatiguing exercise of human muscle. *Neurology* 1990; 40: 240-44.
22. Renaud JM. The effect of lactate on intracellular pH and force recovery of fatigued sartorius muscles of the frog, *Rana pipiens*. *J Physiol (Lond)* 1989; 416: 31-47.
23. Karlsson J. Lactate and phosphagen concentrations in working muscle of man. *Acta Physiol Scand* 1971; 81: 1-72.
24. Osnes J, Hermansen L. Acid-base balance after maximal exercise of short duration. *J Appl Physiol* 1972; 32: 59-63.