

Interpretación práctica de gases sanguíneos según el esquema fisiológico

Dr. Aristides Baltodano Agüero

Unidad de Cuidados Intensivos

Hospital Nacional de Niños “Dr. Carlos Sáenz H”

Departamentos de Pediatría y Medicina Crítica Pediátrica.

Coordinador Nacional del Posgrado en Medicina Crítica Pediátrica

Universidad de Costa Rica

Teléfono: (506)2222-0122 extensión 4537

San José, Costa Rica

abaltodanoa@hnn.sa.cr

INTRODUCCION

A pesar de que diariamente el metabolismo intermedio produce alrededor de 1 a 1.5 mEq/Kg de ácidos, el organismo mantiene un control muy estricto del balance ácido base. Existen muchos mecanismos que regulan o intervienen en el equilibrio ácido base. El presente análisis considera básicamente el equilibrio relacionado con la ecuación de Henderson Hasselbalch. Dejaremos por fuera el efecto de la disociación del H₂O, del HCO₃, asumiremos una temperatura corporal de 37°C para poder facilitar el entendimiento. En todo caso con el esquema tradicional se pueden interpretar la mayoría de los trastornos ácido-base.

BASES QUIMICAS DE LOS TRASTORNOS DEL EQUILIBRIO ACIDO BASE

Ecuación de Henderson Hasselbalch (1).

El producto final del metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y grasas produce CO₂ y H₂O, los cuáles reaccionan en presencia de la enzima anhidrasa carbónica para producir H₂CO₃, el cual a su vez está disociado como H⁺ + HCO₃⁻. La enzima anhidrasa carbónica se encuentra en muchas células del cuerpo, entre ellas los eritrocitos, células parietales del estómago, humor vítreo, riñones, etc; sin embargo el riñón constituye el principal órgano en la regulación de la síntesis de HCO₃⁻.



De acuerdo con la ecuación de Henderson Hasselbalch

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} \text{HCO}_3^- / \text{H}_2\text{CO}_3$$

La concentración de H₂CO₃ se puede calcular con base en el paCO₂ de la siguiente manera:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} \text{HCO}_3^- / \text{paCO}_2 \times 0.03$$

En condiciones fisiológicas la relación: HCO₃⁻/paCO₂ x 0.03 es igual a 20, por lo que la ecuación quedaría así:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} 20$$

La pKa del H_2CO_3 es 6.1 y el \log_{10} de 20 es 1.3, de ahí que a temperatura corporal de 37°C el pH fisiológico es:

$$\text{pH} = 6.1 + 1.3$$

$$\text{pH} = 7.4 \text{ (7.35 a 7.45)}$$

Los valores normales para una altitud de unos 1250 metros sobre el nivel del mar (tal y como se definieron hace más de 30 años en la ciudad de Salt Lake, Utah, EUA) son para adultos y niños (excepto neonatos y lactantes menores)

$$\text{pH} = 7.35 \text{ a } 7.45$$

$$\text{paCO}_2 = 35 \text{ a } 45 \text{ mm Hg}$$

$$\text{HCO}_3^- = 22 \text{ a } 26 \text{ mEq/L}$$

Para efectos de simplificar el entendimiento del equilibrio ácido base diremos que todo lo relacionado con cambios en el HCO_3^- es regulado por el riñón (metabólico) y lo relacionado con el H_2CO_3 (paCO_2) es regulado por los pulmones (respiratorio). Asimismo, tomaremos como valores de referencia los siguientes:

$$\text{pH} = 7.4$$

$$\text{paCO}_2 = 40 \text{ mm Hg}$$

$$\text{HCO}_3^- = 24 \text{ mEq/L}$$

De tal manera que llamaremos acidosis a aquel trastorno ácido base que tenga un pH menor de 7.4 y alcalosis a aquel cuyo pH sea mayor que 7.4.

Definiciones (1).

El sufijo “emia” significa sangre, de tal manera que acidemia y alcalemia significan sangre ácida o sangre alcalina respectivamente.

El sufijo “osis” se utiliza para indicar que existe un trastorno del equilibrio ácido-base, pero sin mencionar el valor del pH.

Ejemplo: “el paciente tiene una acidosis metabólica”. En este caso no estamos diciendo cual es el valor del pH. En cambio, si decimos: “el paciente tiene un pH de 7.1”, en ese caso debemos mencionar que el paciente tiene una acidemia. Ahora bien, si el paciente tiene un pH dentro de los límites fisiológicos normales, pero existe algún trastorno ácido-base (ya sea porque está compensado o porque es leve), entonces utilizamos el sufijo “osis”.

Acidemia/acidosis metabólica: es aquel trastorno que se caracteriza por tener un HCO_3^- disminuido. Es decir, el cambio primario es un descenso en el HCO_3^- . Si en condiciones fisiológicas la relación $\text{HCO}_3^-/\text{paCO}_2 \times 0.03$ es igual a 20, entonces un descenso en el HCO_3^- significa que la relación anterior será menor que 20, por lo tanto el \log_{10} será menor que 1.3, por lo tanto el pH resultante será menor que 7.4 (acidosis).

Alcalemia/alcalosis metabólica: en este caso el pH resultante se debe a un aumento en el HCO_3^- . De la misma manera, la relación $\text{HCO}_3^-/\text{paCO}_2 \times 0.03$ es mayor que 20, por lo que el \log_{10} será mayor que 1.3 y el pH resultante mayor que 7.4 (alcalosis).

Acidemia/acidosis respiratoria: trastorno ácido-base caracterizado por tener un paCO_2 aumentado. En este caso la relación la relación $\text{HCO}_3^-/\text{paCO}_2 \times 0.03$ es menor que 20, por lo que el \log_{10} será menor que 1.3 y el pH resultante menor que 7.4 (acidosis).

Alcalemia/alcalosis respiratoria: en este caso el cambio primario es un descenso del paCO_2 . Debido a esto, la relación $\text{HCO}_3^-/\text{paCO}_2 \times 0.03$ es mayor a 20, por lo que el \log_{10} será mayor que 1.3 y el pH resultante mayor que 7.4 (alcalosis).

Respuesta compensatoria: es la respuesta que se produce siempre ante una alteración del equilibrio ácido base. Esta respuesta trata de acercar el pH a lo normal de tal manera que la

relación $\text{HCO}_3^-/\text{paCO}_2 \times 0.03$ se acerque a 20. Así pues una acidosis metabólica (descenso del HCO_3^-) se compensa con un descenso en el paCO_2 , una alcalosis metabólica (aumento del HCO_3^-) se compensa con un aumento en el paCO_2 , una acidosis respiratoria (aumento del paCO_2) se compensa con un aumento en el HCO_3^- , una alcalosis respiratoria (descenso del paCO_2) se compensa con un descenso en el HCO_3^- . Como se puede observar en los trastornos ácido-base simples los cambios en el HCO_3^- y en el paCO_2 ocurren en el mismo sentido.

TRASTORNOS DEL EQUILIBRIO ACIDO BASE

Acidosis metabólica (1).

Los principales mecanismos por los que se produce una acidosis metabólica son:

- 1- Ganancia de un ácido. Este ácido puede ser un ácido endógeno que normalmente no está presente o lo está en pequeñas cantidades (ejemplo: cetoacidosis diabética, acidosis láctica) o exógeno (ejemplo: intoxicación por salicilatos).
- 2- Pérdida de base (HCO_3^-). Usualmente por el tracto gastrointestinal o renal.

La mejor manera de diferenciarlo es calculando la brecha aniónica.

Brecha aniónica (BA): en condiciones fisiológicas no existe ninguna BA ya que el principio de neutralidad eléctrica establece que siempre existe el mismo número de cargas positivas y negativas. Si por alguna razón aumentan o disminuyen los cationes, los aniones también aumentan o disminuyen para mantener el balance eléctrico neutro en el sistema. En forma arbitraria podemos relacionar los iones más abundantes en el líquido extracelular (LEC) e ignorar los que contribuyen con menos cargas eléctricas. De esta manera definimos la BA como la

diferencia entre la suma de los cationes más abundantes (Na^+ y K^+) y la de los aniones más abundantes (Cl^- y HCO_3^-). Algunos no toman en cuenta al K^+ . De esta manera la BA sería:

$$\text{BA} = \text{Na}^+ - (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-)$$

$$\text{BA} = 140 - (100 + 24)$$

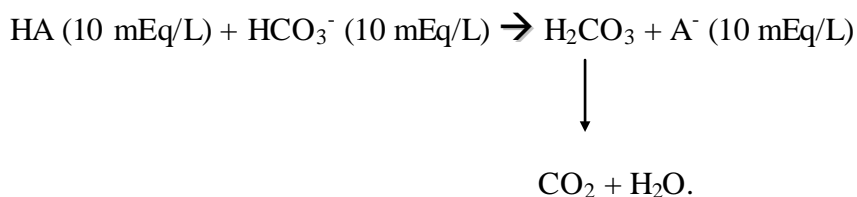
$$\text{BA} = 140 - 124$$

$$\text{BA} = 16 \text{ (12 } \pm \text{ 4 mEq/L)}$$

Esa diferencia corresponde a los aniones que no estamos considerando y de todos ellos las cargas eléctricas negativas generadas por la albúmina son las más importantes; de ahí que la presencia de hipoalbuminemia puede confundirnos al analizar la brecha aniónica, sobretodo cuando queremos determinar si existe una brecha aniónica aumentada.

Acidosis metabólica causada por la ganancia de un ácido (con BA aumentada).

Si en el medio aparecen, por ejemplo, 10 mEq/l de un ácido (llamémoslo HA), éste será neutralizado por el HCO_3^- , produciéndose la siguiente reacción:



El CO_2 se elimina por los pulmones. El sistema convierte un ácido fuerte en un ácido débil y lo elimina por el pulmón. Este es un sistema “buffer” (amortiguador) abierto el cual es más eficiente como amortiguador.

Si calculamos la BA (asumiendo que se consumieron 10mEq/L de HCO_3^-) tenemos:

$$\text{BA} = \text{Na}^+ - \text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-$$

$$\text{BA} = 140 - (100 + 14)$$

$$\text{BA} = 140 - 114$$

$$\text{BA} = 26$$

Como puede apreciarse, la BA aumentó. Sin embargo, esa diferencia de 10 mEq/L significa que existe en el sistema un anión (no medible) producto de la neutralización de un ácido. En nuestro caso ese anión es A^- (ver ecuación arriba).

Acidosis metabólica causada por la pérdida de HCO_3^- (con BA normal o hiperclorémica).

En caso de pérdidas de HCO_3^- (ejemplo: por riñón o por el tracto digestivo) se produce, por definición, una acidosis metabólica. En este caso la BA se conserva ya que el Cl^- aumenta en la misma proporción para mantener el balance eléctrico neutro. Veamos:

$$\text{BA} = \text{Na}^+ - \text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-$$

$$\text{BA} = 140 - (110 + 14)$$

$$\text{BA} = 140 - 124$$

$$\text{BA} = 16$$

De esta manera podemos fácilmente encontrar el mecanismo de la acidosis metabólica y buscar la causa clínica.

Alcalosis metabólica (1).

La alcalosis metabólica se debe a una ganancia de sustancias alcalinas (ejemplo: ingesta de antiácidos), por pérdida de hidrogeniones y Cl^- (ejemplo: vómitos o sondas nasogástrica). La

contracción del volumen intravascular (terapia con diuréticos, fibrosis quística) produce pérdidas de líquido rico en Cl^- y pobre en HCO_3^- , lo cual aumenta el HCO_3^- (rara vez por encima de 3 a 5 mEq/L. solamente los riñones y el estómago son capaces de generar suficiente HCO_3^- para provocar una alcalosis metabólica significativa. Durante la hipovolemia, el riñón retiene Na^+ y H_2O . El Na^+ es reabsorbido sin importar cual es el ión acompañante Cl^- o HCO_3^- , de ahí que en hipovolemia, el riñón sacrifica la tonicidad o el balance ácido-base para mantener el volumen plasmático.

Trastornos respiratorios (1).

A diferencia de los trastornos metabólicos que son compensados simultáneamente por la ventilación (hiper o hipoventilación), los trastornos respiratorios son compensados lentamente por los riñones (de 48 a 72 horas). Sin embargo, en forma aguda, cuando tenemos algún trastorno respiratorio se producen cambios en la concentración de HCO_3^- debido a la siguiente ecuación:



Si el paCO_2 aumenta, entonces se producirá más H^+ (acidosis), pero también más HCO_3^- (corresponde al aumento que se observa durante la acidosis respiratoria aguda). Por otro lado, si el paCO_2 disminuye, entonces ocurre lo contrario.

Por esa razón existen trastornos respiratorios agudos (cuando la compensación es producto de la reacción anterior) o crónicos cuando la compensación renal es completa (después de 48 a 72 horas). Algunos expertos consideran una tercera categoría (subagudos) cuando el trastorno respiratorio aun no está compensado completamente por el riñón.

COMPENSACION DE LOS TRASTORNOS DEL EQUILIBRIO ACIDO BASE

Todo trastorno del equilibrio ácido-base genera una respuesta compensatoria la cual se puede estimar o calcular en base a fórmulas conocidas desde hace muchos años. Estas fórmulas son muy útiles en niños y adultos. En recién nacidos tienen limitaciones debido principalmente a la inmadurez del riñón. Es muy importante notar que las compensaciones tienen un límite máximo para cada trastorno; además, ningún trastorno se compensa más allá de lo esperado. Es decir, no existe sobrecompensación. Si en el momento de analizar la compensación resulta que ésta sugiere una sobrecompensación, es porque existe un trastorno mixto.

INTERPRETACION DE LOS GASES SANGUINEOS (1).

Como puede observarse en la tabla 12.1, solamente existen 6 trastornos simples, 2 de ellos son metabólicos y 4 respiratorios (agudos y crónicos). Se pueden presentar trastornos mixtos por combinación de los simples. El pH nos indica si se trata de una acidosis o una alcalosis y el PaCO_2 y el HCO_3^- nos indican si se trata de un trastorno metabólico o respiratorio (tabla 12.2).

Para efectos de simplificar el análisis tomaremos como referencia los siguientes valores:

$\text{pH} = 7.4$. Por encima de este valor lo llamaremos alcalosis y por debajo lo llamaremos acidosis.

$$\text{PaCO}_2 = 40 \text{ mm Hg}$$

$$\text{HCO}_3^- = 24 \text{ mEq/L.}$$

Estos dos últimos valores los utilizamos para calcular las compensaciones de los diferentes trastornos ácido base.

Guía para la interpretación de los trastornos ácido base (1,2).

1- Historia clínica y examen físico.

La historia clínica y el examen físico sugieren el tipo de trastorno que puede estar presente. Así pues, una historia de diarrea con deshidratación sugiere una acidosis hiperclorémica. Un paciente con cetoacidosis diabética sugiere una acidosis metabólica con BA aumentada. Una intoxicación aguda con sedantes hipnóticos sugiere una acidosis respiratoria aguda.

2- Cambios en los electrolitos.

También ayudan a identificar tanto los trastornos simples como mixtos.

- Aumento del HCO_3^- : sugiere alcalosis metabólica o acidosis respiratoria compensada.
- Descenso del HCO_3^- : sugiere acidosis metabólica o alcalosis respiratoria compensada.
- Aumento del K^+ : sugiere acidosis.
- Descenso del K^+ : sugiere alcalosis.
- Aumento del Cl^- : sugiere acidosis metabólica hiperclorémica.
- Descenso del Cl^- : sugiere alcalosis metabólica.

Una vez analizado el pH, el paco_2 y el HCO_3^- , podemos, junto con la historia clínica y los cambios en los electrolitos deducir de cual trastorno simple se trata. Posteriormente calculamos la compensación esperada para ese trastorno específico. Si la compensación esperada concuerda con la compensación reportada entonces estamos en presencia de un trastorno compensado. Si la compensación es “parcial”, podemos decir que se trata de un trastorno descompensado. Algunos expertos consideran que si un trastorno está “parcialmente compensado” es porque existe un

trastorno mixto. Esto debido a que el equilibrio ácido base siempre genera una respuesta compensatoria adecuada, la cual debe darse siempre. Esto genera algunas controversias ya que, por ejemplo, si tenemos una acidosis metabólica con un paCO_2 menor de 35 mm Hg, pero insuficiente para compensar esa acidosis (la compensación esperada es menor), estaríamos hablando de una acidosis metabólica más una acidosis respiratoria a pesar de tener un paCO_2 bajo (figuras 12.1 y 12.2)

Trastornos ácido base mixtos (2).

Por lo general son fáciles de identificar. En general se presentan cuando:

- 1- A la hora de realizar el cálculo de la compensación esperada y compararla con la compensación reportada, ésta sugiere una “sobrecompensación”, lo cual sabemos que es imposible.
- 2- Cuando los cambios en el PaCO_2 y el HCO_3^- ocurren en sentido contrario (vimos anteriormente que siempre ocurren en el mismo sentido para compensar el trastorno de fondo).
- 3- Cuando el trastorno ácido base está “parcialmente” compensado o “descompensado”. Este punto, como se mencionó antes, sigue siendo controversial y no es de aceptación universal. Baste con decir y entender que si estamos ante un trastorno “descompensado” se debe tener mucho cuidado con la evolución del paciente ya que su sistema puede terminar de descompensarse y agravar la condición clínica. Ejemplo: un paciente con una acidosis metabólica descompensada puede indicar la presencia de fatiga de los músculos respiratorios y eventualmente presentar una falla respiratoria.

EJEMPLOS ALGUNOS TRASTORNOS ACIDO BASE

1. Un niño de 9 meses ingresa al Servicio de Emergencias con una historia de 24 horas de diarrea y vómitos. Al examen físico se encuentra con una deshidratación del 10%. Entre los exámenes de laboratorio que se solicitaron tenemos los gases sanguíneos.

pH= 7.26

paCO₂= 25 mm Hg

HCO₃⁻= 12 mEq/L

Na⁺= 132 mEq/L

K⁺= 3,3 mEq/L

Cl⁻= 108 mEq/L

¿Cuál es su diagnóstico?

El pH disminuido junto con un HCO₃⁻ hace el diagnóstico de una acidemia metabólica. La compensación esperada (paCO₂ esperado) de acuerdo a la fórmula es (HCO₃⁻ x 1.5 + 8) +/-2, o sea 26 +/-2 mm Hg. Esto nos hace el diagnóstico de una acidemia metabólica compensada. Los iones reportados nos permiten calcular la brecha aniónica: BA= Na⁺ + (Cl⁻ + HCO₃⁻), o sea:

BA= 132 - (108 + 12)= 12mEq/L. Esto confirma que se trata de una “acidemia metabólica compensada con brecha aniónica normal”.

2- Otros ejemplos de acidosis metabólica:

pH= 7.32

paCO₂= 20 mm Hg

HCO₃⁻= 14 mEq/L

Compensación esperada: paCO₂= 29 +/-2 mm Hg

Diagnóstico: en este caso la compensación es más baja de la esperada (lo cual no es posible), por lo tanto este paciente tiene además de la acidemia metabólica una alcalosis respiratoria (porque el paCO_2 está disminuido).

$\text{pH} = 7.15$

$\text{paCO}_2 = 32 \text{ mm Hg}$

$\text{HCO}_3^- = 12 \text{ mEq/L}$

Compensación esperada: $\text{paCO}_2 = 26 \pm 2 \text{ mm Hg}$

Diagnóstico: en este caso la compensación es incompleta, por lo tanto este paciente tiene una “acidemia metabólica descompensada”. Debido a que el sistema debe ser capaz de compensar a la acidosis, hay que considerar que el paciente puede estar en riesgo de una fatiga de los músculos respiratorios, por lo que algunos expertos consideran que en realidad debe tratarse de una “acidemia metabólica más un acidosis respiratoria”.

$\text{pH} = 7.01$

$\text{paCO}_2 = 48 \text{ mm Hg}$

$\text{HCO}_3^- = 12 \text{ mEq/L}$

En este caso un pH bajo con un paCO_2 alto hacen el diagnóstico de acidosis respiratoria; asimismo un pH bajo con un HCO_3^- bajo hacen el diagnóstico de acidosis metabólica. Puede observarse que el paCO_2 y el HCO_3^- van en sentido contrario. Esta situación solo se da en trastornos mixtos, en este caso por existir un pH bajo se trata de una acidemia mixta (metabólica y respiratoria). La historia clínica nos permitirá decidir si el trastorno primario es de origen metabólico o respiratorio.

3- Ejemplos de trastornos respiratorios

$$\text{pH} = 7.50$$

$$\text{paCO}_2 = 20 \text{ mm Hg}$$

$$\text{HCO}_3^- = 20 \text{ mEq/L}$$

La historia clínica es fundamental para decidir si se trata de un trastorno agudo o crónico. En el caso anterior si la historia sugiere un trastorno agudo, entonces la compensación esperada es:

$\text{HCO}_3^- = 20 \text{ mEq/L}$. En este caso el diagnóstico es “alcalemia respiratoria aguda compensada”.

$$\text{pH} = 7.46$$

$$\text{paCO}_2 = 20 \text{ mm Hg}$$

$$\text{HCO}_3^- = 14 \text{ mEq/L}$$

Si la historia sugiere un trastorno agudo, entonces la compensación esperada es: $\text{HCO}_3^- = 20 \text{ mEq/L}$. Como vemos, el HCO_3^- está más bajo de lo esperado lo cual no es posible para un trastorno simple, por lo tanto el diagnóstico es: “alcalemia respiratoria aguda mas acidosis metabólica” (el HCO_3^- está bajo). Si por el contrario la historia es sugestiva de un trastorno crónico entonces la compensación esperada es: $\text{HCO}_3^- = 14 \text{ mEq/L}$. En este caso el diagnóstico es “alcalemia respiratoria crónica compensada”.

$$\text{pH} = 7.60$$

$$\text{paCO}_2 = 28 \text{ mm Hg}$$

$$\text{HCO}_3^- = 32 \text{ mEq/L}$$

En este caso un pH alto con un paCO_2 bajo hacen el diagnóstico de alcalosis respiratoria; asimismo un pH alto con un HCO_3^- alto hacen el diagnóstico de alcalosis metabólica. Puede observarse que el paCO_2 y el HCO_3^- van en sentido contrario. Esta situación solo se da en trastornos mixtos, en este caso por existir un pH alto se trata de una alcalemia mixta (metabólica y respiratoria). La historia clínica nos permitirá decidir si el trastorno primario es de origen metabólico o respiratorio.

Tabla 12.1. Guía para la interpretación de los gases sanguíneos

Trastorno ácido-base	Cambio primario	Respuesta compensatoria	Compensación esperada	Límite de compensación
Acidosis metabólica	↓↓↓ HCO_3^-	↓↓ paCO_2	$\text{paCO}_2 = 1.5 (\text{HCO}_3^-) + 8 \pm 2$ $\text{paCO}_2 = \text{últimos 2 dígitos del pH}$	10 mm Hg
Alcalosis metabólica	↑↑↑ HCO_3^-	↑↑ paCO_2	$\text{paCO}_2 \uparrow 0.5- 1.0 \text{ mm Hg por cada mEq/L de aumento en el } \text{HCO}_3^-$ $\text{paCO}_2 = 0.7 \times \text{HCO}_3^- + 20 \pm 5$	55 mm Hg
Acidosis respiratoria aguda	↑↑↑ paCO_2	↑ HCO_3^-	$\text{HCO}_3^- \uparrow 1.0 \text{ mEq/L por cada } 10 \text{ mm Hg de aumento en el } \text{paCO}_2$	30 mEq/L
Acidosis respiratoria crónica	↑↑↑ paCO_2	↑↑ HCO_3^-	$\text{HCO}_3^- \uparrow 3.5 \text{ mEq/L por cada } 10 \text{ mm Hg de aumento en el } \text{paCO}_2$	45 mEq/L
Alcalosis respiratoria aguda	↓↓↓ paCO_2	↓ HCO_3^-	$\text{HCO}_3^- \downarrow 2.0 \text{ mEq/L por cada } 10 \text{ mm Hg de descenso en el } \text{paCO}_2$	18 mEq/L
Alcalosis respiratoria crónica	↓↓↓ paCO_2	↓↓ HCO_3^-	$\text{HCO}_3^- \downarrow 5.0 \text{ mEq/L por cada } 10 \text{ mm Hg de descenso en el } \text{paCO}_2$	12-15 mEq/L

Modificado de referencias 1 y 2

Tabla 12.2. Guía para la interpretación de los trastornos ácido base

pH bajo (Acidosis)	HCO_3^- disminuido (Metabólica)	paCO_2 elevado (Respiratoria)
pH elevado (Alcalosis)	HCO_3^- elevado (Metabólica)	paCO_2 disminuido (Respiratoria)

Figura 12.1 Compensación de trastornos metabólicos

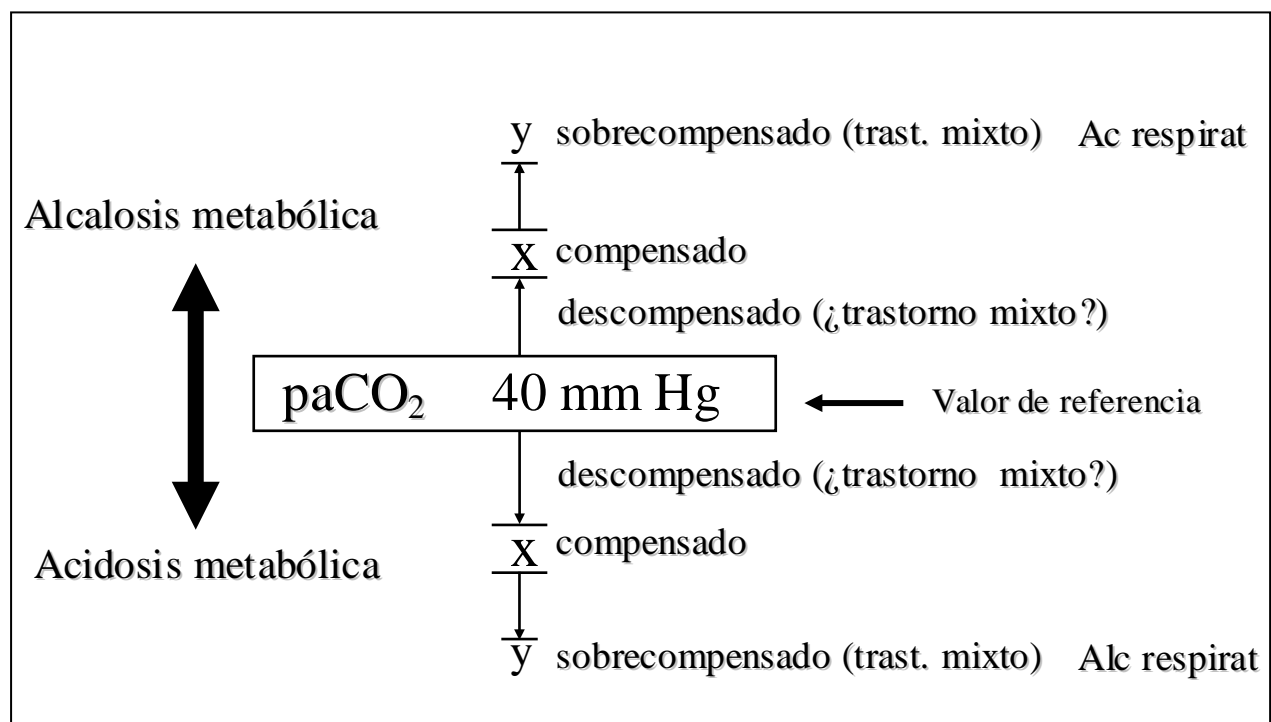
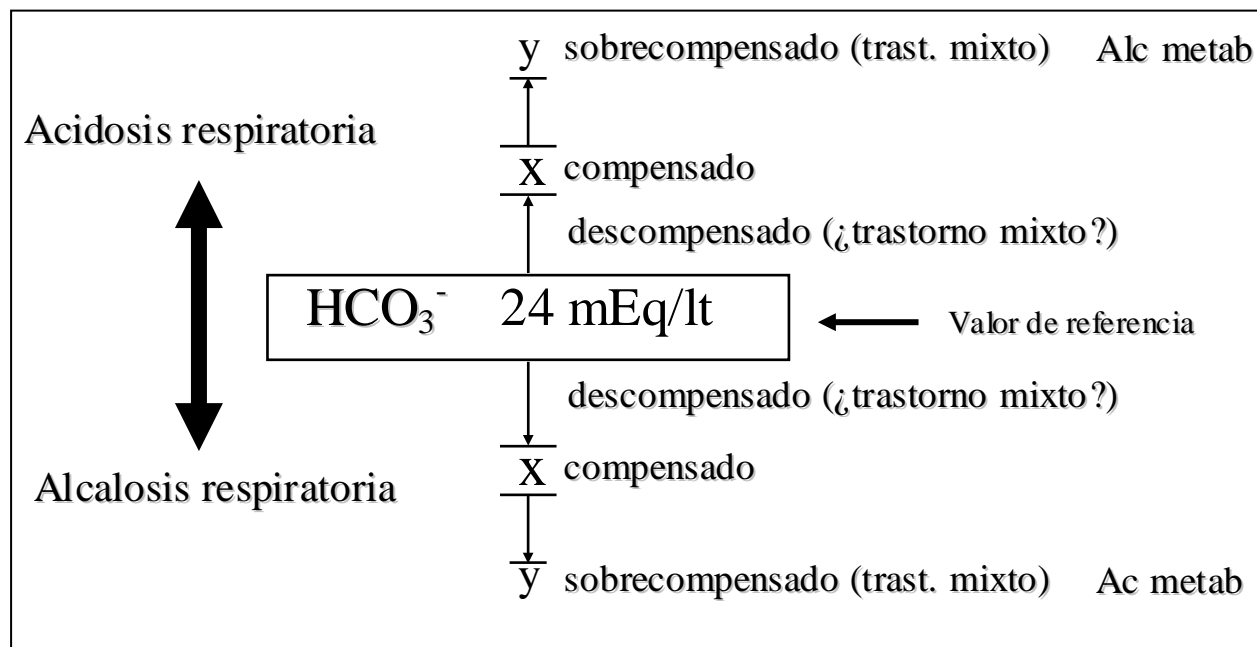


Figura 12.2 Compensación de trastornos respiratorios (agudos y crónicos).



REFERENCIAS

- 1- Farins RG and Gardner LB. Simple acid base disturbances. Med Clin NA 1981; 65: 321-346
- 2- Bia M and Their SO. Mixed acid base disturbances: A clinical approach. Med Clin NA 1981; 65: 347- 361.