

Article

Aplicación de Principios Físicoquímicos al Estado Acido-Base del Músculo Esquelético

Michael I. Lindinger¹, John M. Kowalchuk² y George J. F. Heigenhauser³¹*Department of Human Biology and Nutritional Sciences, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*²*Canadian Centre for Activity and Aging; School of Kinesiology, and Department of Physiology and Pharmacology, The University of Western Ontario, London, Ontario, Canada*³*Department of Medicine, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada*

Durante las últimas cinco décadas la química ácido-base se ha tornado polémica entre los fisiólogos. En parte, esto se debió a un movimiento de fisiólogos alejados de las descripciones clásicas de la química ácido-base de las soluciones fisiológicas tal como fueran desarrolladas en las investigaciones de Lawrence Henderson (ej. 12), Donald van Slyke y Cullen (30) y otros (15, 17, 22) en las primeras décadas del último siglo. Otro factor que contribuyó con la controversia fue la invención y el uso del electrodo protón-selectivo: la primera valoración semi cuantitativa de la concentración de protones en el músculo fue descrita en 1914 por Michaelis y Kramsztyk (26), y las primeras mediciones confiables en el músculo fueron realizadas por Furusawa y Kerridge en 1927 (5) con la posterior conversión matemática de $[H^+]$ a pH. La facilidad con que se podía medir la $[H^+]$ condujo directamente al concepto de procesos pH dependientes. Uno de estos procesos es la fatiga del músculo esquelético. Como advertencia de nuestro presente tratamiento del estado ácido-base del músculo, es necesario reconocer que la carga positiva en el agua pura está representada físicamente por el ion oxonio o hidronio (H_3O^+) y que es habitual que los físico-químicos y fisiólogos ignoren el agua unida al protón, y hacen referencia al H^+ (3).

Robergs y colegas (27) abrieron nuevamente un debate desafiante sobre los mecanismos subyacentes de acidosis metabólica inducida por el ejercicio, ácido láctico y su asociación con la fatiga del músculo esquelético (4). Descripciones previas planteadas por Gevers (6), Jones (16) y Hochachka y Mommsen (13) parecían ser ampliamente ignoradas o no aceptadas. Los objetivos de este trabajo fueron resaltar el enfoque descrito por Robergs et al. (27), particularmente en los niveles conceptuales y cualitativos, y demostrar cómo la consideración de la físico-química del ambiente intracelular de las células musculares nos brinda una visión adicional y finalmente una descripción más completa y adecuada del estado ácido-base. Específicamente, un enfoque físicoquímico demuestra que el comportamiento físico de las moléculas en las soluciones acuosas es independiente de los mecanismos de transporte y amortiguación (*buffer*); más bien, su comportamiento físico y la estequiometría aparente de los protones de las reacciones bioquímicas dependen de las interacciones físicoquímicas con el agua, con la limitación agregada de que las leyes físicas y químicas deben ser cumplidas.

Debe quedar muy claro a partir de la revisión de Robergs et al. (27), y de la respuesta de Kemp (18), que las reacciones bioquímicas que participan en la producción glucógenolítica y glucolítica de ATP producen piruvato (no ácido pirúvico) que luego puede convertirse en lactato (no ácido láctico) a través de la reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH); no están claros los motivos por los cuales otros investigadores discrepan con esta visión (2). Además, cuando se observa como una serie de reacciones vinculadas o como un sistema de reacciones casi instantáneas o simultáneas, la producción de lactato no se asocia con una producción neta estequiométricamente equivalente de protones (H^+). Es desafortunado, aunque no sorprende, que el enfoque numérico (semi cuantitativo) para contar protones adoptado por Robergs et al. (27) provoque una crítica cuantitativa por parte de Kemp (18). Estos esfuerzos por determinar cuantitativamente la estequiometría de producción/consumo de protones por medio de reacciones bioquímicas y por los

mecanismos de amortiguación de protones dificultan la interpretación y limitan la demostración de la producción de lactato independiente del aumento en la concentración de protones intracelular. Las descripciones de Kemp (18) y de investigadores previos (6, 13, 16), de las ionizaciones parciales de productos metabólicos siguen siendo útiles desde la perspectiva de entender las reacciones bioquímicas en diferentes condiciones de $[H^+]$ intracelular. Sin embargo, estas descripciones representan un esfuerzo incompleto por explicar dos leyes físicas: la conservación de la masa y mantenimiento de la electro neutralidad en las soluciones. Tal como lo reconocen los fisiólogos clásicos de ácido base como Henderson y van Slyke, y como lo han detallado Harned y Owen (8) y Edsall y Wyman (3), es indispensable que la estequiometría aparente del equilibrio de protones dentro de las reacciones bioquímicas se considere en el contexto del entorno físico en el cual se producen las reacciones, a saber, el agua. Las ionizaciones parciales descritas en las reacciones bioquímicas son el resultado directo de cómo los sustratos y los productos de la reacción alteran el comportamiento de la solución acuosa en la que se producen las reacciones. Estas ionizaciones parciales están presentes dentro de estas ecuaciones de reacción porque se debe mantener el balance de carga (ley física de electro neutralidad) (ver debajo). Tal como señalan Robergs et al. en su carta de respuesta (28), es necesario realizar trabajos adicionales sobre la dependencia del H^+ de las reacciones bioquímicas y sobre la amortiguación de protones en el músculo. Las metodologías indirectas para estimar la producción/consumo de protones y amortiguación intracelular de los mismos, proporcionan una estructura simplificada para entender las alteraciones ácido-base del músculo. Sin embargo, carecen de la visión mecánica y no contribuyen significativamente a aumentar nuestra comprensión sobre el equilibrio ácido-base del músculo.

Tanto Robergs et al. (27) como Kemp (18) destacan la importancia de la fisicoquímica en sus intentos por describir y comprender la bioquímica celular. Sin embargo, sus tratamientos de fisicoquímica explican incompletamente la conservación de la masa dentro de las reacciones bioquímicas y el mantenimiento de la electro neutralidad dentro de las soluciones acuosas. Por lo tanto estos tratamientos son inherentemente inadecuados tanto con respecto a la contribución del lactato- con el estado ácido-base intracelular como con respecto a la amortiguación de protones estructural no asociada al bicarbonato debida a la presencia de concentraciones apreciables de ácidos débiles disociados. El conocimiento de la fisicoquímica de las soluciones acuosas es esencial para comprender el comportamiento físico de las moléculas en estas soluciones, independientemente de cómo estas moléculas llegaron allí (transporte, reacciones bioquímicas). Esto se reconoce en los textos modernos de físico química, pero nosotros apoyamos los tratamientos más clásicos de Harned y Owen (8) y Edsall y Wyman (3).

Peter Stewart, el físico químico que resumió la base fisicoquímica para el conocimiento de la fisiología de los fluidos corporales (17), reintrodujo y aclaró el concepto de análisis fisicoquímico del estado ácido base de los fluidos corporales desde una perspectiva fisiológica (29). Este trabajo representó un retorno al pensamiento de Henderson y van Slyke y otros investigadores menos-conocidos del equilibrio ácido base de principios del siglo 20 (15, 22). Stewart (29) enfatizó que la $[H^+]$ (o el menos preferido, pH) y la $[HCO_3^-]$ son variables ácido-base dependientes; es decir, no provocan alteraciones ácido-base. Sin importar cual es la fuente bioquímica de los protones, estas variables ácido-base dependientes no pueden ser consideradas como factores independientes para determinar su propia concentración. En esencia, la noción de $[H^+]$ (pH) como variable independiente se remonta al constructo de Hasselbalch (9) del trabajo de Henderson (11) que dio origen a la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Además, Stewart y otros investigadores anteriores a él reconocieron que los protones no se producen o se consumen por reacciones químicas y es incorrecto usar estos términos en el contexto de los protones.

Una de las claves para entender la bioquímica metabólica en las soluciones acuosas es que todas las reacciones ocurren en un medio que tiene una concentración de agua de aproximadamente 55,5 mol/l (3, 8). Además de esto, el agua se encuentra principalmente en su estado asociado (H_2O), y la disociación en H^+ y HO^- está regulada, en parte, por la relación:

$$K_w [H_2O] = [H^+][HO^-] \text{ (Ecuación 1)}$$

donde la constante de disociación de agua (K_w) es muy pequeña [$\sim 4,4 \times 10^{-14} \text{ (Eq/l)}^2$], y por consiguiente también las concentraciones de $[H^+]$ y $[HO^-]$ son muy bajas ($\sim 10^{-7} \text{ Eq/l}$). La Ecuación 1 puede volverse a escribir como (2) o (2a)

$$\text{Ecuación 2: } [H^+] = (K_w[H_2O]) / [HO^-] \text{ o}$$

$$\text{Ecuación 2a: } [H^+] = K'w / [HO^-]$$

donde el $K'w = K_w [H_2O]$. Además no se acepta demasiado que las moléculas individuales de H^+ y HO^- tienen una existencia efímera (3, 8); su tasa de disociación/asociación con el agua está en el orden de $10^6/s^{-1}$ (1). Esto plantea el interrogante de si alguna molécula individual de H^+ o HO^- existe durante el tiempo necesario para participar sustantivamente en una reacción bioquímica o en un proceso de transporte de membrana. Además, debido a que la concentración de agua es tan grande, y que la de H^+ es tan baja, el agua aporta efectivamente un suministro infinito de protones, tal como se requiere en cualquier reacción bioquímica que puede requerir un protón, y de manera similar, los

protones que se forman en las reacciones bioquímicas pueden asociarse nuevamente con HO⁻.

Una segunda clave para entender la bioquímica metabólica en las soluciones acuosas es reconocer que todos los iones en la solución regulan la disociación del agua y por lo tanto también la concentración de H⁺. En todas las soluciones acuosas la concentración de H⁺ está regulada por tres leyes fundamentales de acción de masa (8): 1) la conservación de masa; 2) el estado de equilibrio entre el agua y los electrólitos débiles, tal como lo establecen sus constantes de equilibrio; y 3) el mantenimiento de la neutralidad eléctrica.

Es lamentable que los fisiólogos que trabajan con los músculos y el ejercicio pasen por alto frecuentemente una o más de estas leyes cuando aplican interpretaciones a la bioquímica muscular y sanguínea y al estado ácido base. Es posible demostrar en un tubo de ensayo, midiendo la [H⁺] de soluciones, que algunas de las reacciones bioquímicas metabólicas asociadas con la provisión de energía parecen consumir o generar protones (puede ver una síntesis en 6, 13, 16, 18, 21, 27). Este enfoque es útil porque demuestra la conservación de la masa tal como se ejemplifica en las ecuaciones que resumen las reacciones bioquímicas. Sin embargo, al aplicar las ecuaciones que resumen las reacciones bioquímicas metabólicas en el músculo, la mayoría de los investigadores descuida el equilibrio fundamental entre el agua y los sustratos/productos de la reacción por lo que no se cumple la tercera ley; el mantenimiento de neutralidad eléctrica.

Según Peter Stewart (29), el principio fundamental de mantener la neutralidad eléctrica proporciona el "eslabón entre las concentraciones de los iones fuertes no reaccionantes y los iones débiles equilibradores. Su base física es la ley de Coulomb que describe las grandes fuerzas eléctricas que entran en juego siempre que se produce un desbalance de cargas". Haciendo referencia a la monografía de Guggenheim (7), Stewart (29) destaca, en particular, que ese pequeño desequilibrio de cargas produciría "fuerzas eléctricas muy grandes", por lo que los desequilibrios de carga sólo ocurren efímeramente. La alta tasa de equilibrio de carga requerida sería provista por el agua. Nuestra discusión siguiente requiere una introducción a los iones débiles y fuertes, tal como se ha manifestado previamente (10, 15, 21, 23, 24).

El mantenimiento de la neutralidad eléctrica se refiere al hecho que las soluciones acuosas siempre son eléctricamente neutras, es decir, la suma de todas las concentraciones de los iones cargados negativamente es igual a la suma de las concentraciones de los iones cargados positivamente (29):

Ecuación 3:

$$\Sigma[\text{cationes básicos fuertes}] - \Sigma[\text{aniones ácidos fuertes}] + \Sigma[\text{cationes básicos débiles}] - \Sigma[\text{aniones ácidos débiles}] + [\text{H}^+] - [\text{HO}^-] = 0$$

El estado ácido base se determina por los efectos independientes del dióxido de carbono (PCO₂), la concentración total de aniones ácidos débiles diferentes al carbonato ([Atot]), y la diferencia de carga entre la suma de cationes básicos fuertes y aniones ácidos fuertes, denominada diferencia de iones fuertes [SID]; es decir, las tres variables ácido-bases independientes cuyas interacciones determinan finalmente la [H⁺] y [HO⁻] en la solución. En esta formulación fisicoquímica correcta, la [lactato⁻], a través de su efecto en la [SID] es un importante determinante independiente de la [H⁺] muscular. Durante la contracción del músculo, los cambios en cada una de las tres variables independientes se producen simultáneamente. Por consiguiente, en cualquier momento, la [H⁺] debe ajustarse a las relaciones [Atot]: ácidos débiles disociados, PCO₂:HCO₃⁻, y H⁺:HO⁻ que alcanzan todas el equilibrio instantáneo. En el resto de esta sección simplificaremos nuestra discusión enfocándonos solamente en los iones fuertes, tal que:

$$[\text{SID}] = \Sigma[\text{cationes básicos fuertes}] - \Sigma[\text{aniones ácidos fuertes}]$$

(Ecuación 4)

Las cargas residen en los iones, entre los que se incluye a productos de la disociación de agua (HO⁻ y H⁺), los iones fuertes [aquéllos que están totalmente o casi completamente disociados como Na⁺, K⁺, Cl⁻, Mg²⁺, Ca²⁺, lactato⁻, piruvato⁻, fosfocreatina²⁻ (PCr²⁻)], y los iones débiles (aquéllos que sólo se disocian parcialmente como el HCO₃⁻ y los numerosos intermediarios de la glucólisis), tal como se mencionan en las publicaciones de Gevers (6), Hochachka y Mommsen (13), y más recientemente en la Tabla 2 del trabajo de Robergs et al. (27).

Dentro del músculo esquelético en contracción, la mayor actividad glucolítica produce una acumulación neta de aniones ácidos fuertes (principalmente lactato⁻ y una pequeña cantidad de piruvato⁻) y aniones ácidos débiles (la mayoría de los otros intermediarios de la glucólisis). Por definición, el mantenimiento de la neutralidad eléctrica establece que el aumento neto en las concentraciones de aniones ácidos afectará el equilibrio entre los dos iones débiles más abundantes en la solución, a saber HO⁻ y H⁺. Un aumento en la concentración de moléculas de aniones ácidos debe estar acompañado por un aumento semejante en la concentración de cargas positivas netas, y estas cargas positivas serán aportadas principalmente por la disociación de agua.

Así, en una solución acuosa que contiene sólo iones fuertes, la Ecuación. 1 puede ser simplificada a (5)

$$[\text{SID}] + [\text{H}^+] - [\text{HO}^-] = 0$$

Sustituyendo $K^w/[\text{H}^+]$ por $[\text{HO}^-]$ (de Ecuación. 2) en la Ecuación 5:

$$\text{Ecuación 6: } [\text{H}^+]^2 + [\text{SID}] [\text{H}^-] - K^w = 0$$

Lo que es igual a:

$$\text{Ecuación 7: } [\text{H}^+] = (K^w + [\text{SID}]^2/4)^{1/2} - [\text{SID}]/2$$

A partir de la ecuación 7, se puede demostrar que el aumento en la concentración de aniones ácidos fuertes (lo que disminuye la $[\text{SID}]$) contribuye directamente con un aumento en $[\text{H}^+]$. Esto es causa y efecto.

El punto principal de la descripción anterior es que uno puede tomar el enfoque de contar los protones producidos o consumidos en las reacciones bioquímicas metabólicas, y determinar así la estequiometría bioquímica de las reacciones individuales. Sin embargo, este enfoque está incompleto porque no considera las asociaciones de los sustratos y productos de la reacción con el agua. Además los aniones de ácidos débiles intracelulares (conocidos como sistema buffer de protones estructural sin bicarbonato) tienen una gran capacidad de amortiguar instantáneamente y simultáneamente los protones. Por consiguiente, no es físicamente posible que las reacciones bioquímicas metabólicas contribuyan *per se* con los aumentos moderados en la $[\text{H}^+]$ intracelular.

En el músculo esquelético contracción, los cambios en las concentraciones de iones fuertes son los contribuyentes físicos y químicos más importantes del aumento en $[\text{H}^+]$; esto es pura física y química. Aunque la PCO_2 y $[\text{Atot}]$ también contribuyen, sus contribuciones con la $[\text{H}^+]$ muscular durante el ejercicio son menores que las de los iones fuertes (19, 22, 24) y debido a que el enfoque de este trabajo está en el ion fuerte lactato-, éstos no serán considerados de ahora en adelante. Las reacciones bioquímicas nos ayudan a comprender por qué cambian las concentraciones de los iones fuertes metabólicos (orgánicos); sin embargo, a menudo esta comprensión no se ha extendido a los iones fuertes inorgánicos que también contribuyen al estado ácido-base intracelular (21, 24, 29). Entre los principales iones fuertes inorgánicos en el músculo esquelético están los cationes básicos fuertes Na^+ y K^+ y el anión ácido fuerte Cl^- . Los principales iones fuertes orgánicos son la fosfocreatina (PCr^{2-}), que en si misma es un anión ácido fuerte divalente ($\text{pK}' = 4.5$), y el lactato- ($\text{pK}' = 3.9$). El efecto primario de los cambios en las concentraciones de iones sobre la concentración de protones del músculo durante la contracción es una disminución en la concentración de K^+ intracelular, lo que a su vez reduce la $[\text{SID}]$ intracelular (porque $[\text{Na}^+]$ y $[\text{Cl}^-]$ se acumulan en un nivel similar, ver la Ref. 25). Con el ejercicio de alta intensidad, se produce rápidamente una reducción neta en $[\text{K}^+]$ y, a través de su efecto en la $[\text{SID}]$ intracelular, se produce un aumento en $[\text{H}^+]$ (Ecuación. 7). Sin embargo, junto con este cambio se produce una hidrólisis simultánea de PCr^{2-} . La rápida hidrólisis de PCr^{2-} reduce su concentración lo que tiene un efecto directo en el aumento de la $[\text{SID}]$ intracelular y por lo tanto produce una disminución en $[\text{H}^+]$ (Ecuación 7). En los primeros segundos de la transición descanso-trabajo la disminución en $[\text{PCr}^{2-}]$ aumenta efectivamente la $[\text{SID}]$, y por lo tanto la $[\text{H}^+]$ debe descender. Además debemos reconocer que la hidrólisis de PCr^{2-} produce creatina que es eléctricamente neutra y que la hidrólisis subsiguiente de ATP por la reacción de la creatin quinasa produce fosfato inorgánico que es un ácido débil. Por consiguiente la hidrólisis de PCr^{2-} es una estrategia fuerte para aumentar $[\text{SID}]$ y reducir la $[\text{H}^+]$ intracelular, aunque aumentando modestamente $[\text{Atot}]$. A medida que las actividades glucogenolíticas y glucolíticas se incrementan, aumenta progresivamente la concentración del anión ácido fuerte lactato-, y su acumulación neta no es equilibrada eficientemente por los cambios simultáneos en otros iones fuertes intracelulares. Así, la disminución en la $[\text{K}^+]$ y el aumento en $[\text{lactato-}]$ intracelulares simultáneos, producen disminuciones progresivas en la $[\text{SID}]$ intracelular porque la $[\text{PCr}^{2-}]$ puede no cambiar adicionalmente o puede aumentar si la demanda de ATP está reducida. La acumulación y/o aumento desigual de cationes y aniones durante el ejercicio produce una disminución en la $[\text{SID}]$ intracelular (alteración en el equilibrio de iones fuertes y débiles en la solución), lo que contribuye directamente y fisicoquímicamente con el aumento en la $[\text{H}^+]$ durante el ejercicio de intensidad moderada a alta (19, 21, 24, 29). Robergs et al. (27) afirman que la magnitud de este aumento es también proporcional a 1) las concentraciones de ácidos débiles disociados (es decir, la capacidad buffer muscular estructural no dependiente de bicarbonato); 2) la tasa en la que los equivalentes ácidos (aniones ácidos fuertes como PCr^{2-} , piruvato-, y lactato-) se acumulan o remueven en el musculo, o son consumidos por el musculo y 3) la tasa en la que los cationes básicos fuertes son incorporados o removidos por el músculo (25).

Muchos fisiólogos y científicos médicos usan el término acidosis láctica debido a una nomenclatura lodosa atrincherada dentro de la literatura y no a una falta de conocimiento inherente al mecanismo de producción de lactato-. No obstante, para despejar el mito de acidosis láctica, Robergs et al. (27) tuvieron un abordaje forzado y un rechazo abierto de construcciones en general. Nosotros creemos que esto no se justifica y, de hecho, es incoherente dentro de su revisión. Por ejemplo, Robergs et al. (27) definieron una "construcción" como una "interpretación no fáctica y no demostrada, que ha

sido aceptada erróneamente como un hecho". Aunque las construcciones pueden favorecer nuestra comprensión de conceptos difíciles, es necesario reconocer que normalmente son interpretaciones absolutamente cualitativas que pueden o no ser exactas y, para algunos, pueden o no mejorar la comprensión. Para desacreditar la construcción de la producción de ácido láctico, Robergs et al. (27) utilizaron otras construcciones que tampoco están fundamentadas con hechos que apoyen sus argumentos. Éstos incluyen la construcción de la amortiguación metabólica de protones intracelular independiente del bicarbonato y la construcción del cotransporte de lactato- y H^+ . Con respecto a éste último, la consideración de la fisicoquímica del agua revela que es muy improbable que los H^+ se transporten físicamente y que el movimiento del lactato- solo desde un lado de una membrana al otro es suficiente para producir las respuestas medidas de H^+ . De hecho, ya en 1920, Jacobs (14) demostró que los iones H^+ no atraviesan la membrana celular. Y sí, el pH también es una construcción, aunque fundamentada en hechos y puede ser útil.

En conclusión, es útil e instructivo seguir con precisión el camino de los protones en las vías metabólicas. Nosotros coincidimos con los datos sintetizados por otros (18, 27, 28) acerca de que el ácido láctico no se produce en el músculo y que no está presente en concentraciones significativas. Es meritorio aportar una síntesis útil de las reacciones bioquímicas subyacentes involucradas en la producción de energía dentro del músculo e identificar las especies correctas de sustratos y productos metabólicos. Sin embargo, el fracaso para aplicar la totalidad de los principios fisicoquímicos conduce a la conclusión incorrecta y engañosa que el lactato- no está relacionado con la acidosis metabólica del ejercicio. Por consiguiente, nosotros afirmamos que la acumulación de lactato- dentro del músculo esquelético contribuye directamente con la acidosis intracelular, en virtud del hecho que es un anión ácido fuerte que altera fundamentalmente el comportamiento del agua. Con respecto al equilibrio ácido-base, es inadecuado considerar cada reacción bioquímica independientemente, y es igualmente inadecuado tratar de vincularlas temporalmente o en una secuencia bioquímica. El equilibrio ácido-base cambia instantáneamente; por consiguiente, un conocimiento más detallado sobre la acidosis del ejercicio debe considerar las reacciones bioquímicas de transporte y amortiguación de protones simultáneas, así como sus interacciones fisicoquímicas instantáneas y simultáneas con el agua, en cualquier momento. Tal como lo estableció Norman Jones en 1980 (16): "Las relaciones bioquímicas simples sobre rendimiento, sólo nos aportan una visión estrecha de la liberación de protones porque se ignora el estado iónico de los reactivos. Dado que pueden existir en forma de ácidos o bases, las cargas netas deben ser tenidas en cuenta. La referencia a un texto de bioquímica (20) demostrará que las ecuaciones pueden ser escritas con mayor precisión y la fuente de protones no será lo que parecía al principio."

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Bruce Gladden, Simeon Cairns y a Norman Jones por sus valiosas discusiones y comentarios.

REFERENCIAS

1. Agmon N., Huppert D., Masad A. and Pines E. (1991). Excited-state proton transfer to methanol-water mixtures. *J. Phys. Chem.* 95: 10407-10413.
2. Böning D., Beneke R. and Maassen N. (2005). Lactic acid still remains the real cause of exercise-induced metabolic acidosis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R902-R903.
3. Edsall J.T. and Wyman J. (1958). Biophysical Chemistry. *Thermodynamics, Electrostatics, and the Biological Significance of the Properties of Matter*. New York: Academic. Vol. 1.
4. Fitts R.H. Cellular mechanisms of muscle fatigue. (1994). *Physiol. Rev.* 74: 49-94.
5. Furusawa K and Kerridge P.M.T. (1927). The hydrogen ion concentration of the muscles of the cat. *J. Physiol.* 63: 33-41.
6. Gevers W. (1977). Generation of protons by metabolic processes in heart cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 9: 867-874.
7. Guggenheim E.A. (1957). Thermodynamics, an Advanced Treatment for Chemists and Physicists. *Amsterdam: North-Holland*. p. 372-373.
8. Harned H.S and Owen B.B. (1958). The Physical Chemistry of Electrolytic Solutions (3rd ed.). *New York: Reinhold Publishing*.
9. Hasselbalch K. (1912). Neutralitätsregulation und reizbarkeit des atemzentrums in ihren Wirkungen auf die koklensäures-pannung des Blutes. *Biochem. Z* 46: 403-439.
10. Heigenhauser G.J.F. (1995). A quantitative approach to acid-base chemistry. *Can. J. Appl. Physiol.* 20: 333-340.
11. Henderson L. (1908). The theory of neutrality regulation in the animal organism. *J. Biol. Chem.* 21: 427-448.
12. Henderson L.J., Bock A.V., Field H., Stoddard J.L. (1924). Blood as a physicochemical system. *J. Biol. Chem.* 59: 379-431.
13. Hochachka P.W. and Mommsen T.P. (1983). Protons and anaerobiosis. *Science* 219: 1391-1397.
14. Jacobs M.H. (1920). The production of intracellular acidity by neutral and alkaline solutions containing carbon dioxide. *Am J*

Physiol 53: 457-463.

15. Johnson R.L., Heigenhauser G.J.F., Hsia C.C.W., Jones N.L. and Wagner P.D. (1996). Determinants of gas exchange and acid-base balance during exercise. In: *Handbook of Physiology. Section 12. Exercise: Regulation and integration of Multiple Systems*, edited by Rowell LB and Shepherd JT. New York: Oxford, p. 515-584.
16. Jones N.L. (1980). Hydrogen ion balance during exercise. *Clin. Sci. (Lond)* 59: 85-91.
17. Jones N.L. (1995). Our debt to Peter Stewart. *Can. J. Appl. Physiol.* 20: 327-332.
18. Kemp G. (2005). Lactate accumulation, proton buffering, and pH change in ischemically exercising muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R895-R901.
19. Kowalchuk J.M., Heigenhauser G.J., Lindinger M.I., Sutton J.R. and Jones N.L. (1988). Factors influencing hydrogen ion concentration in muscle after intense exercise. *J. Appl. Physiol.* 65: 2080-2089.
20. Lehninger A.L. (1975). *Biochemistry* (2nd ed.). New York: Worth Publishers.
21. Lindinger M.I. (1995). Origins of [H⁺] changes in exercising skeletal muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 20: 357-368.
22. Lindinger M.I. (2003). Exercise: a paradigm for multi-system control of acid-base state. *J. Physiol.* 550: 334 (Epub).
23. Lindinger M.I. (2004). Acid-base physiology during exercise and in response to training. In: *Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and Clinical Sciences of the Athletic Horse*, edited by Hinchcliff KW, Kaneps AJ, and Geor RJ. New York: Elsevier, p. 586-611.
24. Lindinger M.I and Heigenhauser G.J.F. (1990). Acid-base systems in skeletal muscle and their response to exercise. In: *Biochemistry of Exercise VII*, edited by Taylor AW, Gollnick PD, Green HJ, Ianuzzo CD, Nobb TC, Meturei C, and Sarla JR. Champaign, IL: Human Kinetics. p. 341-357.
25. Lindinger M.I and Heigenhauser G.J.F. (1991). The roles of ion fluxes in skeletal muscle fatigue. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69: 246-253.
26. Michaelis L. and Kramsztyk A. (1914). Dir Wasserstoffionenkonzentration der Gewebssaft. *Biochem Z* 62: 180-185.
27. Robergs R.A., Ghiasvand F. and Parker D. (2004). Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R502-R516.
28. Robergs R.A and Parker D. (2005). Lingering construct of lactic acidosis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R904-R910.
29. Stewart P.A. (1981). How to Understand Acid-Base. *A Quantitative Primer for Biology and Medicine*. New York: Elsevier.
30. van Slyke D. and Cullen G. Studies of acidosis. I. (1917). The bicarbonate concentration of the blood plasma; its significance, and its determination as a measure of acidosis. *J. Biol. Chem.* 30: R289-R346.

Cita Original

Michael I. Lindinger, John M. Kowalchuk, and George J. F. Heigenhauser. Applying physicochemical principles to skeletal muscle acid-base status. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R891-R894. 2005