

# MÉTODO SIMPLIFICADO PARA DETERMINAR LA CURVA DE DISOCIACIÓN DE OXÍGENO (CDO)

## Simplified method for determination of the Oxygen Dissociation Curve (ODC)

Edgar CRISTANCHO<sup>1\*</sup>, Mauricio SERRATO<sup>2</sup>, Dieter BÖNING<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Fisiología Animal y Celular, Universidad Nacional de Colombia. Carrera 30 n°. 45-03. Bogotá D.C., Colombia.

<sup>2</sup>Centro de Ciencias de Deporte, Coldeportes, Cra. 56a n°. 61-25. Bogotá D.C., Colombia.

<sup>3</sup>Institut für Physiologie, Campus Mitte, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1- Virchowweg 6, 10117 Berlin, Alemania.

\*For correspondence: [ecristancho@unal.edu.co](mailto:ecristancho@unal.edu.co)

**Received:** 14<sup>th</sup> December 2017, **Returned for revision:** 10<sup>th</sup> October 2018, **Accepted:** 27<sup>th</sup> November 2018.

**Associate Editor:** Nubia E. Matta.

**Citation/Citar este artículo como:** Cristancho EE, Serrato M, Böning D. Método simplificado para determinar la Curva de Disociación de Oxígeno (CDO). Acta biol. Colomb. 2019;24(2):354-360. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v24n2.69420>

### RESUMEN

La afinidad de la hemoglobina (Hb) por oxígeno (O<sub>2</sub>) es un factor importante que influye en el transporte de este gas, especialmente en hipoxia y en diferentes enfermedades como anemia o fibrosis quística. En la medición de la afinidad se usa la determinación de la curva de disociación Hb:O<sub>2</sub>. El método presentado para establecer la curva de disociación Hb:O<sub>2</sub> (CDO) simplifica los protocolos normalmente utilizados, ya que elimina el requerimiento del equipo específico para equilibrar la sangre con oxígeno en niveles fijos de presión parcial (PO<sub>2</sub>). Mediante el uso de ecuaciones matemáticas es posible establecer la cinética de saturación de la hemoglobina (SO<sub>2</sub>) a valores crecientes de PO<sub>2</sub>. De igual forma, mediante el método se determinan aspectos típicos de la unión Hb: O<sub>2</sub> como la dependencia del pH (coeficiente de Bohr) y el tipo de asociación de la proteína con su ligando mediante el diagrama de Hill. En virtud de la simplificación realizada, el método es aplicable en prácticas de laboratorio en población humana y animal, así como en la investigación de diferentes condiciones experimentales.

**Palabras clave:** Afinidad hemoglobina – oxígeno, coeficiente de Hill, efecto Bohr, presión parcial de oxígeno, saturación arterial de oxígeno.

### ABSTRACT

The affinity of hemoglobin (Hb) for oxygen (O<sub>2</sub>) is an important factor influencing the transport of this gas especially in hypoxia and in different diseases such as anemia or cystic fibrosis. By the affinity measurement, the determination of the Hb: O<sub>2</sub> dissociation curve is used. The presented method to establish the Hb: O<sub>2</sub> oxygen dissociation curve (CDO) simplifies the protocols normally used, since it eliminates the requirement of specific equipment to equilibrate blood with oxygen at fixed levels of oxygen pressure (PO<sub>2</sub>). By using mathematical equations, it is possible to establish the saturation change of hemoglobin (SO<sub>2</sub>) at increasing oxygen partial pressure. Similarly, the method determines typical aspects of the Hb: O<sub>2</sub> binding as the pH dependence (Bohr coefficient) and the association type of protein with its ligand by the Hill diagram. By this simplification, the method is applicable in laboratory practices in human and animal population, as well as in the investigation of different experimental conditions.

**Keywords:** Arterial oxygen saturation, Bohr effect, hemoglobin – oxygen affinity, Hill-plot, oxygen partial pressure.

## INTRODUCCIÓN

La condición para el suficiente aporte de oxígeno a los tejidos es la existencia de la molécula transportadora, hemoglobina, en los eritrocitos. Esta liga el oxígeno en los pulmones reversiblemente y lo entrega a los tejidos. Las propiedades funcionales que son influenciadas por diferentes factores (construcción molecular de la Hb, fosfatos, temperatura, ácidos, entre otros) se pueden medir mediante la determinación de la curva de asociación al oxígeno (dependencia de la saturación porcentual de la presión parcial de oxígeno). Los parámetros decisivos son la forma sigmoidea medida como la pendiente  $n$  en el diagrama de Hill y la posición de la relación  $SO_2$ - $PO_2$ , medida como presión de oxígeno que logra el 50 % de saturación ( $P_{50}$ ), el cual se informa normalmente en condiciones estándar, es decir 37 °C, pH 7,4 y presión parcial de  $CO_2$  ( $PCO_2$ ) de 40 mmHg. Para el ajuste a estos valores se requieren los correspondientes factores de corrección para el efecto de ácidos y de la temperatura. Ya que el trabajo muscular, hipoxia y diferentes enfermedades modifican estos efectos, es de gran significado medir las modificaciones de la afinidad.

La determinación de la Curva de Disociación de Oxígeno (ODC) bajo condiciones fisiológicas es de crítica importancia en el estudio de las funciones respiratorias (Rossi-Bernardi *et al.*, 1975). Fisiológicamente la hemoglobina no solo es importante en el transporte de  $O_2$  y de  $CO_2$ , sino en el equilibrio ácido-básico de la sangre (Ferry, 1924). Mediante las propiedades de unión de la proteína al oxígeno es posible inferir la oferta de oxígeno en el ambiente que habitan los organismos de acuerdo con el medio que respiran. Hall y McCutcheon, (1938) determinaron que la hemoglobina del pez sapo, el cual vive en aguas abisales, presenta un traslado de la curva de equilibrio hacia la izquierda con relación a la curva desplazada completamente a la derecha del jurel, el cual habita aguas superficiales con mayores niveles de oxígeno disuelto. Cuando el medio ventilatorio es aire, una adaptación semejante se ha comprobado en camélidos suramericanos de gran altura (Chiodi, 1971).

En el establecimiento de la cinética de unión Hb:  $O_2$  han contribuido en forma independiente muchos fisiólogos (e.g. Christian Bohr y August Krogh). La cuantificación de todos los valores que intervienen en la forma de la ODC (moduladores de la afinidad, presión parcial de oxígeno, saturación arterial) elevó el requerimiento de equipos debido a la obligada medición en forma separada de las variables, volviendo el procedimiento muy dispendioso. De otro lado, las muestras de sangre debían ser primero tratadas para producir soluciones puras de hemoglobina. Los protocolos, los reactivos, así como los equipos utilizados en el establecimiento de la CDO han sido de diferente índole, lo cual puede ser revisado en los estudios de Van Slyke, (1918), Sidwell *et al.*, (1938), Drabkin y Schmidt, (1945), quienes llevaron a cabo las primeras investigaciones en la asociación Hb:  $O_2$ .

Existen diferentes métodos para medir la curva de disociación, que nuestro grupo de trabajo ha empleado durante años. En las primeras investigaciones la sangre fue equilibrada con diferentes mezclas de gas ( $CO_2 + O_2$ ) y el contenido de  $O_2$  posteriormente medido. El pH sanguíneo se ha calculado a partir de  $PCO_2$  y del correspondiente contenido de gas en la sangre. (Böning *et al.*, 1975; Braumann *et al.*, 1988). Una posibilidad adicional para esta determinación ha sido la mezcla de volúmenes de sangre totalmente saturada e insaturada con contenido de  $O_2$  conocido y medición posterior de  $PO_2$  y de pH (Meier *et al.*, 1974), mediante lo cual se pueden obtener fácilmente una gran cantidad de puntos. Con modernos analizadores de gases sanguíneos se pueden determinar con mayor facilidad  $PO_2$ ,  $PCO_2$  y pH en lugar del contenido de oxígeno y de la saturación. Cuando se equilibra sangre simultáneamente con diferentes valores de  $PCO_2$ , o se adicionan sales, o bien ácido láctico, se puede establecer el efecto Bohr para  $HCO_3$  o para ácidos fijos ( $\Delta \log PO_2 / \Delta pH$ ). Esto último, es lo que se ha hecho recientemente en pacientes con fibrosis quística (Böning *et al.*, 2014).

También existen micro métodos, en los cuales pequeñas cantidades de sangre se disuelven con soluciones buffer (y con ello de pH conocido) en las cuales se mide fotométricamente la  $SO_2$  durante la adición de oxígeno (Asakura, 1979). La desventaja de este método es que el ambiente fisiológico del eritrocito (plasma sanguíneo) no está presente, por lo tanto estos métodos han sido reemplazados. La solución buffer fue modificada y se ha adicionado  $CO_2$  al gas de equilibración (Schmidt *et al.*, 1987; Böning *et al.*, 1991). Finalmente es posible medir modificaciones de  $SO_2$  y de  $PO_2$  *in vivo* en la sangre durante hipoxia o trabajo muscular, y a partir de ello, construir curvas de disociación (Böning *et al.*, 1975; Braumann *et al.*, 1979).

En este estudio, el método de mezcla ha sido simplificado ya que no requiere de un equipo de tonometría para equilibrar la sangre en valores fijos de  $PO_2$ . Debido a que esta es una determinación clásica de la fisiología, resulta de gran importancia para estudiantes de las ciencias de la salud y de la vida como la biología y la medicina veterinaria conocer un método sencillo a través del cual sea posible estudiar los aspectos de los cuales depende la asociación Hb:  $O_2$ . El propósito de este artículo es dar a conocer un método sencillo para establecer CDO mediante equipos que se han vuelto comunes en los laboratorios de fisiología en las universidades.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestra de sangre

El método simplificado fue desarrollado inicialmente en Bogotá para la ejecución en el ámbito de prácticas

de laboratorio en las carreras de Medicina, Biología y afines. Una serie de determinaciones fue hecha con sangre venosa de un donante de sexo femenino con las siguientes características: 18 años de edad, un peso corporal de 45,0 kg, una talla de 1,50 m y un IMC de 20,0 kg/m<sup>2</sup>, siendo una atleta entrenada en pruebas de resistencia. La donante se presentó en las horas de la mañana al laboratorio y después de 10 min de reposo (sentada), la muestra de sangre (20 mL) fue retirada de la vena antecubital en tubos al vacío con EDTA como anticoagulante con aplicación de torniquete. La donante leyó y firmó el consentimiento informado, así como generalidades de los procedimientos, los cuales fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Acta No 01, del 22.02, de 2011). A continuación, describimos los principios del método a partir de la información recolectada de una única muestra de sangre.

### Equilibración de la sangre con CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>

Para la determinación se requiere de un analizador de gases arteriales ABL720 (Radiometer, Copenhague, Dinamarca) o de aparatos equivalentes que puedan medir las variables de forma separada con capacidad de registrar simultáneamente PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, la correspondiente saturación (SO<sub>2</sub>) y el pH de la sangre. La muestra puede obtenerse de estudiantes del curso y la determinación puede llevarse a cabo simultáneamente en muestras de sangre provenientes de varios donantes. La sangre fue inicialmente transferida a jeringa de 20 mL y equilibrada con una mezcla de CO<sub>2</sub> al 6,0 % y N<sub>2</sub> al 94,0 % mediante suave y continua agitación en un tiempo de incubación arbitrario de 15–30 min con el propósito de desplazar el oxígeno de la hemoglobina y obtener así el menor valor de SO<sub>2</sub> posible. Luego del paso de equilibración, los valores de SO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub> y PCO<sub>2</sub> fueron medidos en un analizador de gases arteriales a 37 °C para comprobar su reducción.

### Equilibración de la sangre con O<sub>2</sub> y tratamiento matemático

Una vez que el valor de SO<sub>2</sub> alcanzó un rango bajo (10 – 20 %), en el paso anterior, la mezcla de gases fue desechada y pequeñas burbujas de oxígeno puro fueron adicionadas. Después de cada adición, el gas fue mezclado con la sangre y luego desechado, se aseguró que la PCO<sub>2</sub> permaneciera casi constante. Durante la oxigenación de la sangre la PCO<sub>2</sub> se redujo de 48,0 mmHg en el minuto 2 a 45,7 y en el minuto 18 a 4,8 % (ver Tabla 1). Los valores de SO<sub>2</sub> y de PO<sub>2</sub> fueron registrados cada 2,0 min. En el proceso de oxigenación de la hemoglobina, la jeringa fue girada suavemente para asegurar una mezcla progresiva y para que el resultado después de cada giro condujera a una pequeña elevación en los niveles de SO<sub>2</sub> y de PO<sub>2</sub>, lo cual fue confirmado mediante la medición de los valores. El proceso

de giro fue repetido hasta obtenerse una saturación cercana al 100 %. La medición fue realizada igualmente con una mezcla de gases de equilibración de CO<sub>2</sub> 12 % y N<sub>2</sub> 88 % para establecer el efecto Bohr. La curva resultante de la relación PO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> fue convertida en una relación lineal de acuerdo con Hill mediante la siguiente ecuación:

$$\log\left(\frac{SO_2}{100 - SO_2}\right) = n \log PO_2 - K \quad (1)$$

Donde *n* es la pendiente, *K* el valor de logPO<sub>2</sub> cuando SO<sub>2</sub> es igual a 50 %, es decir el logaritmo en base 10 de la presión parcial de oxígeno que genera el 50 % de la saturación (P<sub>50</sub>). Para establecer el diagrama de Hill, una regresión lineal fue calculada de acuerdo con el siguiente procedimiento. Los valores de PO<sub>2</sub> para niveles fijos de saturación desde 10 hasta 90 % fueron establecidos por interpolación. Del mismo modo, los valores de pH medidos para cada saturación se interpolaron para los niveles de saturación de 10 a 90 %. A partir de las diferencias entre logPO<sub>2</sub> y las diferencias de pH para cada nivel de saturación entre las ODC para 6 y 12 % CO<sub>2</sub>, fueron calculados los coeficientes de Bohr (Dlog PO<sub>2</sub> / DpH). Para esta relación se calculó la siguiente regresión cuadrática:

$$\frac{\Delta \log PO_2}{\Delta pH} = a \times SO_2^2 + b \times SO_2 + c \quad (2)$$

Donde *a*, *b*, y *c* son los coeficientes que se obtienen para el cálculo de una ecuación cuadrática. Para obtener la curva estándar de asociación y la presión estándar de saturación media (P<sub>50</sub>), todos los valores de PO<sub>2</sub> fueron corregidos para niveles fijos de saturación a un pH de 7,4 mediante los coeficientes de Bohr obtenidos de esta forma. Todos los procedimientos fueron revisados y avalados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Los cálculos y tratamientos matemáticos fueron realizados en hojas de cálculo Excel, los valores presentados en las tablas son únicos y como ya se mencionó anteriormente, provienen de una sola muestra de sangre.

## RESULTADOS

La Tabla 1 muestra la secuencia de valores obtenidos en un experimento típico durante la equilibración de la sangre con CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, así como durante la reoxigenación. En el 80 % de los ensayos, el tiempo utilizado en la equilibración con CO<sub>2</sub> + NO<sub>2</sub> fue suficiente para alcanzar en un solo paso un nivel de desaturación suficientemente bajo para iniciar la mezcla con oxígeno puro. Los valores de PCO<sub>2</sub> son elevados debido al torniquete utilizado para tomar la muestra de sangre y al tiempo en que esta reposó en la jeringa hasta

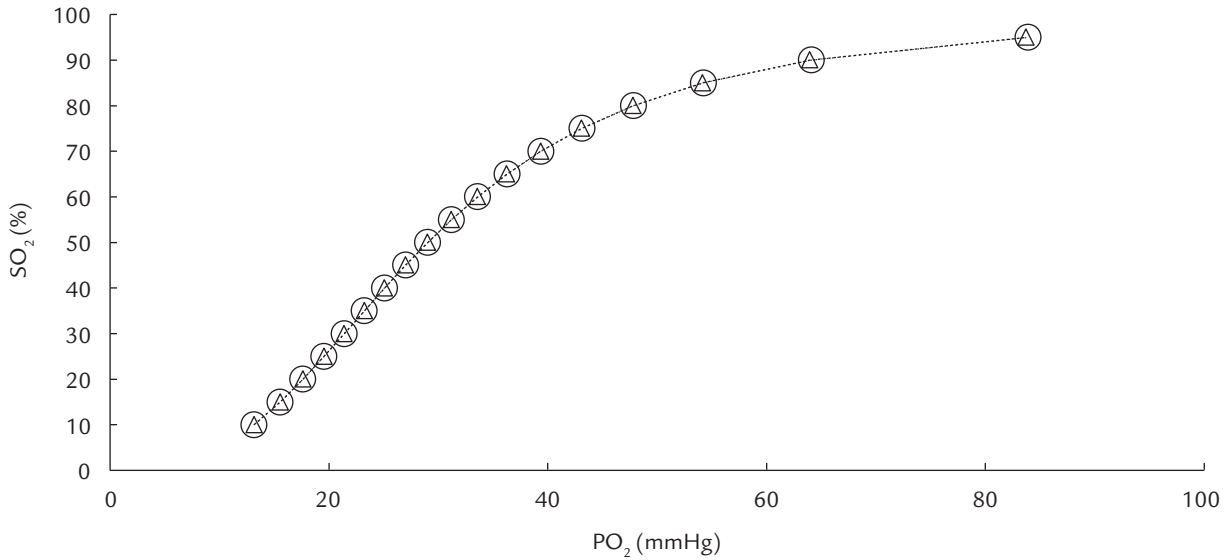
Tabla 1. Valores en la equilibración de la sangre en el establecimiento de la CDO.

	Tiempo (min)	pH	PCO <sub>2</sub> (mmHg)	PO <sub>2</sub> (mmHg)	SO <sub>2</sub> (%)
Línea base		7,254	62,2	31,5	44,5
CO <sub>2</sub> (6 %) + N <sub>2</sub> (94 %)	30,0	7,339	47,7	15,2	13,0
O <sub>2</sub> (100 %)	2,0	7,333	48,0	17,3	13,0
	4,0	7,333	48,3	17,3	17,9
	6,0	7,331	48,1	21,5	26,4
	8,0	7,328	48,1	24,0	31,6
	10,0	7,325	48,0	26,4	37,1
	12,0	7,320	48,1	29,1	42,4
	14,0	7,317	48,0	31,5	47,9
	16,0	7,313	48,2	33,9	53,3
	18,0	7,311	48,1	35,4	56,8
	20,0	7,302	48,3	43,7	69,8
	22,0	7,300	48,0	46,2	73,6
	24,0	7,296	48,3	52,0	79,1
	26,0	7,292	48,0	69,0	89,8
	28,0	7,293	47,7	76,6	92,2
	30,0	7,293	47,1	84,4	93,9
32,0	7,296	46,7	93,3	95,3	
34,0	7,298	45,7	111,0	96,8	

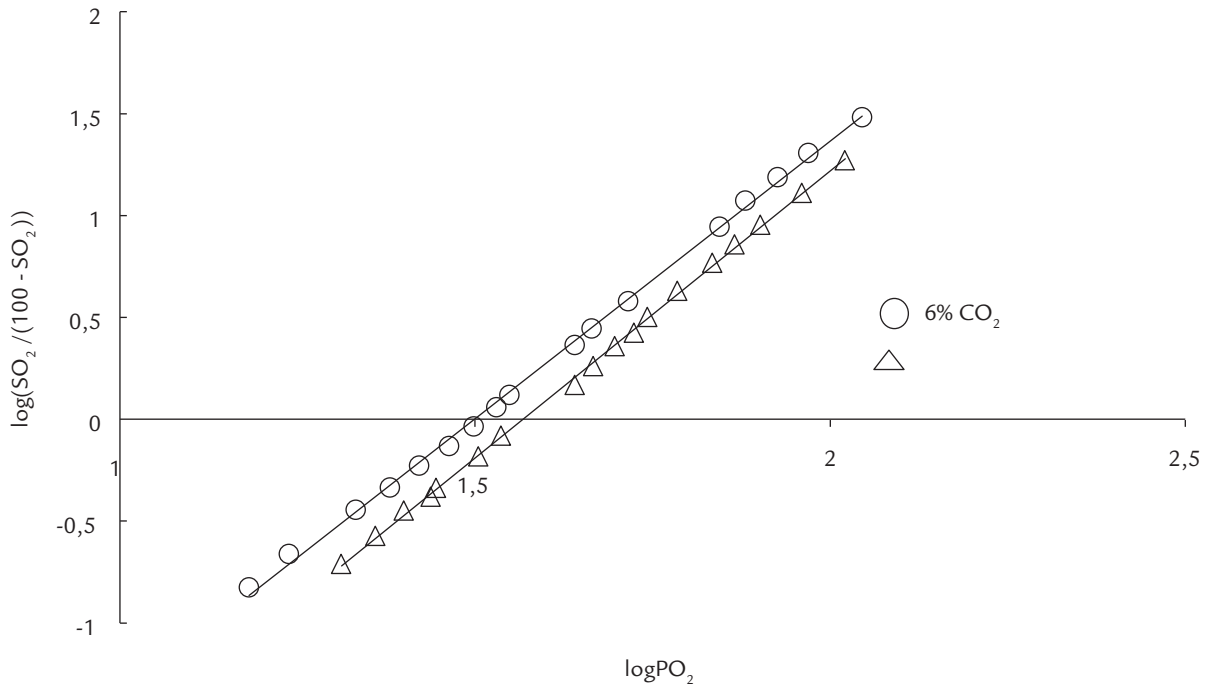
Valores de pH, presión parcial de oxígeno (PO<sub>2</sub>), de dióxido de carbono (PCO<sub>2</sub>) y de saturación arterial (SO<sub>2</sub>) después de 30 minutos de mezcla con CO<sub>2</sub> (6,0 %) y N<sub>2</sub> (94 %), así como saturación progresiva con O<sub>2</sub> puro.

el inicio del experimento. Para los resultados de la determinación estos valores son irrelevantes. Los niveles de PO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> decayeron desde 31,5 mmHg y 44,5 % en la línea base respectivamente hasta 15,2 mmHg y 13,0 % después de 30 min de equilibración con 35 mL de mezcla de gases en los mismos parámetros. La PCO<sub>2</sub> descendió desde 62,2 mmHg en la línea de base 47,7 mmHg después del periodo de equilibración. Como consecuencia de este cambio, el pH ascendió de 7,254 a 7,339. La PCO<sub>2</sub> presentó una variación leve de 2,3 mmHg (Tabla 1) descendiendo desde 48 a 45,7 mmHg en la fase de reoxigenación de la sangre. La saturación de la hemoglobina incrementó en forma paulatina, lo que generó suficientes parejas de valores PO<sub>2</sub>:SO<sub>2</sub> para establecer el transcurso sigmoidal de la asociación. En el rango fisiológico, la mayor saturación (96,8 %) se obtuvo con PO<sub>2</sub> de 111,0 mmHg después de 30 minutos de equilibración.

La reoxigenación de la sangre sucedió en ascensos leves, los cuales permitieron construir la curva de disociación estándar con un transcurso sigmoidal típico para la asociación Hb-O<sub>2</sub> (Fig. 1). La acidificación de la sangre con CO<sub>2</sub> en diferente fracción porcentual produjo curvas estándar con un transcurso tal, que no es posible diferenciar las condiciones de equilibración. De acuerdo con el transcurso de las curvas, la saturación de la sangre se muestra independiente del pH. Sin embargo, el logaritmo en las variables de la curva generó líneas rectas (Diagrama de Hill) con una clara separación para las dos fracciones porcentuales de CO<sub>2</sub>. Las rectas de Hill presentaron coeficientes de regresión elevados (0,999) con pendientes similares de 2,8 y 2,7 para condiciones de equilibración con CO<sub>2</sub> de 6 y 12 % respectivamente (Fig. 2). El coeficiente de Bohr para acidificación con CO<sub>2</sub> fue en promedio 0,43 y mostró una tendencia de incremento leve desde valores bajos hasta medios de saturación para decaer en valores elevados de saturación (Fig. 3).



**Figura 1.** Curva de disociación estándar construida a partir de valores corregidos de  $PO_2$  para niveles fijos de saturación a pH 7,4.



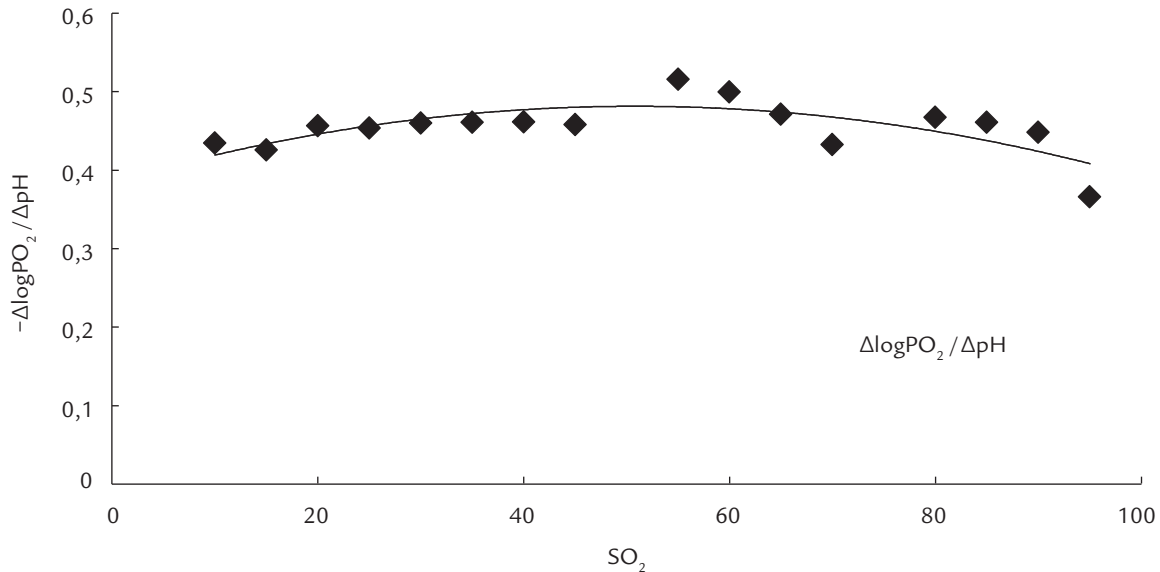
**Figura 2.** Diagrama de Hill para la mezcla de sangre con  $CO_2$  6,0 % +  $N_2$  94 % (ecuación de regresión:  $\log(SO_2 / (100 - SO_2)) = 2,81 \log PO_2 - 4,41$ ;  $r=0,999$ , círculos) y  $CO_2$  12 % +  $N_2$  88 % (ecuación de regresión  $\log(SO_2 / (100 - SO_2)) = 2,82 \log PO_2 - 4,09$ ;  $r=0,999$ , triángulos).

## DISCUSIÓN

A través el método propuesto se logró establecer la CDO de forma simplificada y con mínimos requerimientos de infraestructura. Las ventajas de su uso y aplicación son el poco tiempo requerido (64 min) en los pasos de equilibración y reoxigenación, que permite su implementación en prácticas de laboratorio. Este tiempo se puede reducir en cuanto se logre la experiencia necesaria para conocer la duración mínima de equilibración y disminuir igualmente el número de

puntos. Adicionalmente no se necesitan gases de composición conocida o sistemas de mezcla, y con mayor experiencia, permite reducir el volumen de sangre necesario. Los valores de la muestra de sangre en la línea de base son característicos para sangre venosa, la cual tiene una baja  $SO_2$  y una elevada  $PCO_2$  con un pH acorde a los valores (ver Tabla 1).

Después de 30 min de contacto con el gas adicionado, el equilibrio de  $PCO_2$  y  $PO_2$  no fue completo, pero suficiente para la construcción de la CDO. De igual forma, la  $PCO_2$



**Figura 3.** Coeficiente de Bohr dependiente de la saturación para acidificación de la sangre con CO<sub>2</sub>. Ecuación de regresión:  $-\Delta\log\text{PO}_2/\Delta\text{pH} = -4,5\text{SO}_2^{-2} + 0,0038\text{SO}_2 + 0,3849$ ,  $r = 0,730$ .

disminuyó al 76 % con cambio de solo 0,08 unidades de pH, lo cual evidencia el fuerte poder amortiguador de la sangre y la importancia de la homeóstasis acido-básica en la función respiratoria (Böning *et al.*, 2014). Las CDO con CO<sub>2</sub> al 6 y al 12 % calculadas a pH 7,4, fueron casi iguales y presentaban la típica forma sigmoideal de la unión Hb: O<sub>2</sub>. Este transcurso se obtuvo en razón a una reoxigenación secuencial con elevación en pequeños incrementos en la saturación. La P<sub>50</sub> estándar calculada de 29,5 mmHg es relativamente alta comparada con el valor generalmente aceptado de 27,0 mmHg (Obdahl *et al.*, 2011). Sin embargo, en hombres se han registrado valores superiores de P<sub>50</sub> (Böning *et al.*, 1978; Schmidt *et al.*, 1990; Balabana *et al.*, 2013; Böning *et al.*, 2014). La altura en hombres causa un incremento de la concentración del bifosfoglicerato, no obstante, en las mujeres la causa es aún desconocida.

Cuando la equilibración se hizo con CO<sub>2</sub> al 12 %, el tratamiento matemático permitió discriminar en el diagrama de Hill el efecto de las distintas condiciones en la composición de la mezcla de gases en la equilibración. Las pendientes de las rectas o coeficientes de Hill de 2,8 y 2,7 para equilibración con CO<sub>2</sub> al 6 y 12 % respectivamente son valores cercanos al rango teórico esperado de 2,8 – 3,4 (Holt y Ackers, 2009). La pendiente de un diagrama de Hill no determina el número de sitios de interacción de una proteína con su sustrato sino el grado de interacción o cooperatividad entre ellos. Si  $n$  es igual 1, la unión del ligando no es cooperativa. Un valor de  $n$  mayor que 1 indica cooperatividad positiva en la unión del ligando. Para el caso de la hemoglobina, el valor de  $n$  implica, que la unión de una molécula del ligando facilita la unión de otras (Lehninger, 2005).

El coeficiente de Bohr no está totalmente en concordancia con los valores ya determinados en la población colombiana

habitante de la altura (Schmidt *et al.*, 1990) y en pacientes con fibrosis cística (Böning *et al.*, 2014), una enfermedad pulmonar con origen genético. Esta mutación se ubica en el cromosoma 7 (locus 7q31,2), la cual reduce en pacientes la efectividad de la conductancia transmembranal del regulador CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), el cual es esencial para la secreción de cloro y consecuentemente agua en muchas células. En estas investigaciones, así como en varias anteriores, el valor absoluto  $\Delta\log\text{PO}_2/\Delta\text{pH}$  para acidificación con CO<sub>2</sub> sube con saturaciones bajas. Si esta tendencia es diferente en habitantes con adaptación crónica a la hipoxia, es un tema que debe ser investigado en forma específica en mujeres, ya que Schmidt *et al.*, (1990) establecieron en hombres el efecto de la hipoxia y del ejercicio sobre las propiedades de unión de la hemoglobina al oxígeno. Esta coincidencia en el transcurso de la CDO y el establecimiento de propiedades de unión de la hemoglobina al oxígeno (Coeficientes de Bohr y diagrama de Hill) evidencia la validez de nuestro método en lo que se refiere a la manipulación de la muestra de sangre, así como en la aplicación de las ecuaciones.

## CONCLUSIONES

Mediante el método propuesto se obtuvo la CDO con un transcurso típico de la unión Hb:O<sub>2</sub>. El tratamiento matemático realizado permitió establecer los valores teóricos fijos de PO<sub>2</sub> que pueden corresponder a condiciones experimentales. El tratamiento experimental y matemático propuesto es de fácil implementación en un laboratorio ya que requiere del uso de un solo aparato y de mezclas de gases de fácil consecución con proveedores comerciales. Este método permite el estudio de un tema clásico y obligado

en la fisiología respiratoria, así como de su aplicación en la investigación sobre los efectos sobre la CDO de distintas condiciones como el ejercicio en población humana, la hipoxia ambiental en humanos y animales.

### AGRADECIMIENTOS

Es el deseo de los autores agradecer la excelente asistencia técnica del médico Ernesto Díaz, así como apoyo de la Dirección de Investigación de la sede Bogotá (DIB) de Universidad Nacional de Colombia en la realización del presente estudio mediante el proyecto 7412.

### CONFLICTO DE INTERES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.

### REFERENCIAS

- Asakura T. Automated method for determination of oxygen equilibrium curves of red cell suspensions under controlled buffer conditions and its clinical applications. *Celt Care Med.* 1979;7:391-395.
- Balabana D, Duffinb J, Preiss D, Mardimae A, Vesely A, Slessarev M, et al. The in-vivo oxyhaemoglobin dissociation curve at sea level and high altitude. *Resp Physiol & Neurobiol.* 2013;186:45-52. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.12.011>.
- Böning D, Schweigart U, Tibes U, Hemmer B. Influences of exercise and endurance training on the oxygen dissociation curve of blood under in vivo and in vitro conditions. *Eur J Appl Physiol.* 1975;34:1-10.
- Böning D, Draude W, Trost F, Meier U. Interrelation between Bohr and temperature effects on the oxygen dissociation curve in men and women. *Respir Physiol.* 1978;34:195-207. Doi: [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(78\)90028-2](https://doi.org/10.1016/0034-5687(78)90028-2).
- Braumann KM, Böning D, Trost F. Oxygen dissociation curves in trained and untrained subjects. *Eur J Appl Physiol.* 1979; 42:51-60.
- Böning D, Hollnagel C, Boecker A, Göke S. Bohr shift by lactic acid and the supply of O<sub>2</sub> to skeletal muscle. *Respir Physiol.* 1991;(2):231-243. Doi: [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(91\)90064-P](https://doi.org/10.1016/0034-5687(91)90064-P).
- Böning D, Littschwager A, Hütler M, Beneke R, Staab D. Hemoglobin oxygen affinity in patients with cystic fibrosis. *PLoS One.* 2014;9(2):97932. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097932>.
- Braumann KM, Kleemann W, Martens U, Maassen N, Maass U, Schmidt W, Böning D. Hemoglobin oxygen affinity in patients suffering from occlusive disease of the legs. *Klin Wochenschr.* 1988;66:397-403.
- Chiodi H. Comparative study of the blood gas transport in high altitude and sea level camelidae and goats. *Resp Physiol.* 1971;11:84-93. Doi: [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(70\)90104-0](https://doi.org/10.1016/0034-5687(70)90104-0).
- Drabkin DL, Schmidt CF. Spectrophotometric studies XII. Observation of circulating blood in vivo, and the direct determination of the saturation of hemoglobin in arterial blood. *J Biol Chem.* 1945;157:69-83.
- Ferry RM. Studies in the chemistry of hemoglobin II. A method for the study of the equilibrium between oxygen and hemoglobin. *J Exp Biol* 1924;59:295-327.
- Hall FG, McCutcheon FH. The affinity of hemoglobin for oxygen in marine fishes. *J Cell Comp Physiol.* 1938; 11:205-12. Doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.1030110205>.
- Holt JM, Ackers GK. The Hill Coefficient: Inadequate Resolution of Cooperativity in Human Hemoglobin. *Meth Enzimol.* 2009;455:194-212. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04207-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04207-9).
- Lehninger A. Principles of Biochemistry, Wh Freeman & Co Fourth Edition 2005.
- Meier U, Böning D, Rubenstein HJ. Oxygenation dependent variations of the Bohr coefficient related to whole blood and erythrocyte pH. *Pflügers Arch.* 1974, 349: 203-213.
- Opdahl H, Strømme T, Jørgensen L, Iivä Bajelan, Heier H. The acidosis-induced right shift of the HbO<sub>2</sub> dissociation curve is maintained during erythrocyte storage. *Scand J Clin & Lab Invest.* 2011;71:314-321. Doi: <https://doi.org/10.3109/00365513.2011.565366>.
- Rossi-Bernardi L, Luzzana M, Samaja M, Davi D, DaRiva-Ricci D, Minoli J, et al. Continuous determination of the oxygen dissociation curve for whole blood. *Clin Chem* 1975;21(12):1747-1753.
- Schmidt W, Böning D, Braumann KM. Red cell age effects on metabolism and oxygen affinity in humans. *Respir Physiol* 1987;68(2): 215-225. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0034-56\(87\)80007-5](https://doi.org/10.1016/S0034-56(87)80007-5).
- Schmidt W, Dahners HW, Correa R, Ramirez R, Rojas J, Böning D. Blood gas transport properties in endurance-trained athletes living at different altitudes. *Int J Sports Med.* 1990;11(1):15-21. Doi: <https://doi.org/10.1055/s-2007-1024755>
- Sidwell AE, Munch RH Jr, Guzman Barron ES, and Hogness TR. The salt effect on the Hemoglobin-Oxygen equilibrium. *J Biol Chem.* 1938;123:335-350.
- Van Slyke D. Gasometric determination of the oxygen and hemoglobin of blood. *J Bioch Chem.* 1918;33:127-132.