

Acción de la hipoxia sobre la afinidad de oxígeno de la hemoglobina del ratón

E. E. Guidi, M. A. Carrera, J. L. Scaro y Carmen Miranda

Instituto de Biología de la Altura
Facultad de Medicina
Universidad Nacional de Tucumán
San Salvador de Jujuy (Argentina)

(Recibido el 10 de junio de 1974)

E. E. GUIDI, M. A. CARRERA, J. L. SCARO and C. MIRANDA. *Effect of the Hypoxia on Hemoglobin Oxygen Affinity of the Mouse*. Rev. esp. Fisiol., 30, 229-234. 1974.

Changes of hemoglobin oxygen affinity of the normal mouse caused by exposure to acute hypoxic hypoxia, was compared with those of anemic and polycythemic mice. Oxygen affinity was determined by the rate of release of oxygen from full saturated hemoglobin into a 95 % nitrogen gas phase and by assessing the P_{50} hemoglobin saturation. Acute hypoxia and anemia facilitate oxygen release whereas the polycythemia developed by either chronic exposure to hypoxia or transfusion does not modify substantially this parameter. Anemia and acute hypoxia caused a shift of the oxygen saturation tension to the right relative to that of normal and polycythemic mice.

La teoría general de la eritropoyesis y la de su control humoral en particular se han beneficiado de observaciones experimentales realizadas en pequeños roedores, en especial el ratón. Asimismo, importantes aspectos de la homeostasis eritropoyética se relacionan con un adecuado balance entre oferta y demanda de O_2 a nivel tisular. Por este motivo hemos considerado de interés estudiar en el ratón los aspectos de la función respiratoria que controlan el aporte de oxígeno a los tejidos. En una serie de observaciones anteriores (8) se había encontrado que el aumento de la masa globular (policitemia por exposición a la hipoxia prolongada o inducida por transfusión) se constituye en un ajuste beneficioso para compensar la

reducción de la presión de O_2 en el aire inspirado. Este beneficio, a diferencia de lo que ocurre a otras especies, sigue siendo efectivo aun cuando la policitemia es de grado elevado (hematocrito alrededor de 70 %). En tales condiciones, no obstante la alteración que la hiperviscosidad sanguínea causa en la hemodinámica, los valores de consumo de O_2 y la presión de O_2 a nivel tisular en condiciones de hipoxia severa son mejores en los animales policitémicos que en los normales.

La policitemia y el aumento del lecho vascular se traducen en una mayor cantidad de hemoglobina circulando a través de la unidad de masa cúbica tisular en la unidad de tiempo. Tal incremento cuantitativo del pigmento respiratorio parece,

sin embargo, que no es el único cambio que experimenta la hemoglobina cuando la función de entrega de O_2 a los tejidos se encuentra comprometida. Sumado a los cambios cuantitativos parece ya seguro que la aptitud funcional de la hemoglobina experimenta alteraciones que permiten modular su función posibilitando una mayor entrega de O_2 a los tejidos en aquellas condiciones en que los volúmenes absolutos transportados se han reducido por efecto de una disminución del pigmento transportador (anemia) o cuando la reducción del transporte obedece a una menor saturación, por reducción de la pO_2 en el aire inspirado (hipoxia). En sujetos residentes y en recién llegados a grandes altitudes se observaron desviaciones de la curva de disociación de la hemoglobina hacia la derecha, es decir, la afinidad de este pigmento por el oxígeno decrece, cediéndolo más fácilmente a nivel tisular (1, 11, 18). En estudios realizados en sujetos afectados de malformaciones congénitas cardíacas y con afecciones obstructivas pulmonares se constató la desviación de la curva de disociación de Hb hacia la derecha que se hacía más notable con altos valores de hematocrito (10). Paralelamente se observó que estas alteraciones se acompañan de un aumento de 2-3, difosfoglicerato (D.P.G.) intraeritrocítico, sustancia que tendría la propiedad de modificar la afinidad de la Hb por el oxígeno (12, 13). En anemias de distinta índole, especialmente megaloblásticas e hipocrómicas también se observaron alteraciones de la afinidad de la Hb (9). En estudios comparativos de curvas de disociación de la Hb en mamíferos, en relación al tamaño corporal (15) se encontró que los animales de menor tamaño poseen hemoglobina de menor afinidad como factor compensatorio de su mayor actividad metabólica por unidad de tiempo y de volumen (4).

Con la finalidad de conocer la existencia y magnitud de tales ajustes en la modalidad funcional de la Hb del ratón, he-

mos procedido a estudiar la afinidad de O_2 de la misma en condiciones de normalidad, como asimismo en aquellas condiciones en las que el volumen transportado o la tensión de O_2 se encuentra disminuida. Para este propósito se recurrió a determinar *in vitro* la velocidad de desoxigenación de la Hb, así como la tensión de saturación media (P_{50}).

Material y métodos

Se utilizaron ratones de la cepa C3H/CFW de 8 a 10 semanas de edad. Se realizaron diez determinaciones de 10 animales cada uno. En todos los casos se determinó hematocrito utilizando el micrométodo y el pH se determinó en las muestras al final del período de equilibración en los tonómetros, para lo cual se utilizó un pH analizador (Radiometer). En todos los casos el pH de las muestras osciló entre 7,33 y 7,38.

Determinación de la velocidad de desoxigenación. Se determinó en tonómetros de 30 ml de volumen en los que se colocó 3 ml de sangre heparinizada recién extraída, agregándose por flujo continuo durante dos minutos una fase gaseosa compuesta de O_2 (95 %) y CO_2 (5 %). Se equilibró la muestra en un baño a 37° durante 15 minutos. Al término de este período se tomó una micromuestra en la que se procedió a determinar el volumen total de O_2 contenido y de este valor se derivó la cantidad y concentración de hemoglobina. El resto de la muestra se mantuvo en el mismo tonómetro en el cual se lavó, por flujo rápido, el contenido gaseoso reemplazándolo por una mezcla de 95 % de nitrógeno y 5 % de CO_2 . Los tonómetros se mantuvieron en el baño a 37°, y a los 5 y 10 minutos se procedió a tomar muestras en las que se determinó otra vez el contenido de O_2 . Con estas últimas cifras se obtuvo el porcentaje de saturación de la Hb relacio-

nándolas con los valores de oxigenación 100 por ciento.

Las mismas determinaciones se realizaron sobre muestras de sangre obtenida de ratones anémicos por sangría y policitémicos por transfusión o exposición a la hipoxia. En otros casos se estudió la sangre obtenida a continuación de un período de 24 horas de exposición a la hipoxia (0,4 atmósfera). La anemia se indujo por sangría única hecha por punción cardíaca extrayéndose un volumen igual a un 40 % de la volemia total. El estudio se efectuó 48 horas después de efectuada la sangría. La policitemia por hipoxia se produjo por exposición de los animales en una cámara de hipopresión a 0,4 atmósfera durante 13 días. En este grupo se procedió a estudiar la afinidad por el oxígeno sobre muestras obtenidas inmediatamente de terminar el período hipóxico. Otro grupo de animales fue transfundido con 1,0 ml de glóbulos rojos lavados y 5 días después utilizados para examen de afinidad de O₂.

Determinación de la tensión de saturación media de la hemoglobina (P₅₀). Se procedió a agregar por flujo continuo durante 2 minutos a dos tonómetros conteniendo 1,5 ml de sangre cada uno, una mezcla de gases compuesta de 8,5 % de O₂ en uno de ellos y 4,5 % en el otro, permitiéndose la equilibración en baño a

37° durante una hora. Al cabo de este período se determinó en una micromuestra tomada de ambos tonómetros el volumen de O₂ contenido en ellas. De esta forma, con ambos valores de contenido de oxígeno, uno correspondiente a la mezcla baja de O₂ y otro a la mezcla alta, se obtuvo gráficamente el valor de la tensión de saturación media en el punto en que la línea de unión de ambos valores de contenido de O₂ precitados cortan la horizontal de saturación 50 %. Esta experiencia fue repetida también en animales normales, anémicos, expuestos a hipoxia durante 24 horas y durante 13 días y policitémicos por transfusión.

Determinación del contenido de oxígeno. Se realizó utilizando el método de SCHOLANDER-ROUGHTON (14) sobre micromuestras de 0,04 ml de sangre. El ajuste de la concentración de mezclas gaseosas se efectuó con el microanalizador de gases de SCHOLANDER (16).

Resultados

En la tabla I se aprecian los valores promedio en volúmenes por ciento de O₂ en sangre oxigenada 100 % y luego de ser expuesta durante 5 y 10 minutos a un ambiente desprovisto de O₂. Se indican además los valores por ciento de saturación luego de 5 y 10 minutos de exposi-

Tabla I. *Desoxigenación de sangre de ratón.*
Cada grupo corresponde a 10 animales.

Condición experimental	Ht %	Volúmenes % de O ₂ en sangre (0° y 760 mm Hg)			% de saturación	
		100 % oxigenada	Expuesta a N ₂		5'	10'
Normal	42,9	18,8	11,2	6,6	59,4	35,2
Anémico	30,5	13,0	4,0	1,8	30,9	15,1
Hipoxia 24 horas	41,8	18,1	7,4	2,9	40,8	16,0
Hipoxia 48 horas	45,7	18,8	8,2	3,3	43,6	17,4
Hipoxia 13 días	65,5	24,5	15,5	8,6	63,6	35,5
Policitémico por transfusión	60,1	25,4	16,0	9,5	62,7	37,4

Tabla II. Tensión de saturación 50 % de sangre de ratón (P_{50})

Condición experimental	Ht	P_{50} (mm de Hg)
Normal	42,2	39,5
Anémico	30,1	52,5
Hipoxia 24 horas	41,9	54,5
Hipoxia 13 días	64,6	42,7
Policitémico por transfusión	56,5	50,0

ción a un medio desprovisto de oxígeno. Estos valores demuestran la mayor facilidad con que la hemoglobina de ratones anémicos cede el O_2 cuando se los compara con la de animales normales. En 5 minutos de desoxigenación, la Hb de los normales posee una saturación de 59,4 %, mientras que en los anémicos este valor es de sólo 30,9 % ($P < 0,01$).

Una diferencia similar se encuentra al comparar los valores de ratones normales con los sometidos a hipoxia de 24 horas. El porcentaje de saturación de este último grupo en 5 minutos de desoxigenación es de 40,8 %, siendo la significación estadística de la diferencia entre el grupo normal y el de hipoxia de 24 horas de $P < 0,02$. La velocidad de desoxigenación de la Hb de los grupos policitémicos por hipoxia de 13 días de duración y policitémicos por transfusión no muestran diferencias significativas con el grupo normal ($P < 0,5$).

En la tabla II se registran los valores en mm de Hg de las tensiones de saturación media (P_{50}) en las mismas condiciones experimentales. Mientras en los animales normales se encuentra un valor de 39,5 mm de Hg, en los anémicos este valor es de 52,5 y 54,5 en los expuestos a hipoxia durante 24 horas. En la policitemia por exposición durante 13 días a la hipoxia el valor P_{50} no difiere significativamente de los normales.

Discusión

Nuestros resultados muestran que en esta especie la hemoglobina es capaz de modular la función de entrega de O_2 modificando su afinidad por el gas. Esta propiedad ya demostrada en otros mamíferos (3, 5, 6, 7, 17) y en el hombre (2, 9, 10, 11, 18) aparece claramente en el ratón con anemia o después de la exposición aguda a ambientes hipóxicos. En la hipoxia mantenida durante un período de 13 días, durante el cual se desarrolló un estado policitémico, no se comprobó en cambio diferencia con la afinidad encontrada en el ratón normal. En la policitemia por transfusión en la cual se omitió el estímulo hipóxico la afinidad tampoco mostró diferencias con la de la sangre normal. En el caso de la anemia, al ser ésta mantenida por sangrías repetidas se mantiene asimismo la condición de menor afinidad, mientras que en la hipoxia no ocurre lo mismo, ya que al prolongarse la condición de hipoxia reaparece la normalidad en la afinidad. Esta diferencia puede ser explicada por el cambio que en la capacidad de transporte de O_2 experimenta la sangre durante el período prolongado de hipoxia, hecho que no ocurre cuando se mantuvo la anemia, que implica asimismo mantener el transporte por debajo de la demanda.

Resulta de interés puntualizar la coincidencia cronológica entre el cambio funcional de la hemoglobina que aparece en el curso de la hipoxia de corta duración y en la anemia aguda con la disminución de los volúmenes de O_2 transportados en esas condiciones. Esta coincidencia sugiere que la modulación funcional ocurre como consecuencia de la hipoxemia y desaparece al normalizarse el transporte. Asimismo esta consideración es válida para negar apoyo a la posibilidad de que las variaciones de la afinidad que aquí consideramos se relacione con una modificación estructural de la molécula condicionada por la intensidad del estímulo

eritropoyético. Si así fuere podría haberse esperado que dicha modificación acompañase en su duración a la persistencia en circulación de esa fracción de la hemoglobina sintetizada en condiciones de intenso estímulo eritropoyético.

Surge de estas observaciones que la habilidad de la hemoglobina del ratón para modular su afinidad por el oxígeno debe agregarse a los otros mecanismos ya conocidos que se ponen en juego para compensar la hipoxemia de la anemia o de la hipoxia hipóxica aguda. Al entrar en juego ese mecanismo funcional, sin embargo, debe anotarse el hecho de que lo hace en forma transitoria desapareciendo tan pronto como se normaliza la capacidad de transporte de O₂.

Resumen

Se estudia en ratones, a través de la velocidad de desoxigenación, la afinidad de oxígeno de la hemoglobina en condiciones de normalidad, anemia, hipoxia aguda de 24 horas y policitemia. Asimismo se investiga la tensión de saturación media (P₅₀). Se observa que la sangre de ratón anémico y la de aquellos expuestos a hipoxia hipóxica durante 24 y 48 horas, cede más fácilmente el oxígeno, comparada con la sangre de animales normales y policitémicos por exposición a hipoxia de más de 13 días y policitémicos por transfusión. En las mismas condiciones experimentales la anemia y la exposición aguda a la hipoxia causan una desviación hacia la derecha de los valores de tensión de saturación media de la hemoglobina en relación a la hemoglobina de ratones normales y policitémicos.

Bibliografía

1. ASTE-SALAZAR, H. y HURTADO, A.: *Am. J. Physiol.*, **142**, 733, 1944.
2. BAUER, CH., LUDWIG, M., LUDWIG, I. y BARTELS, H.: *Respir. Physiol.*, **7**, 271, 1969.
3. BAUMANN, R., BAUER, CH. y BARTELS, H.: *Respir. Physiol.*, **11**, 135, 1971.
4. BARTELS, H., HILPERT, P., BARBEY, K., BETKE, K., RIEGEL, K., LANG, E. M. y METCALFE, J.: *Am. J. Physiol.*, **205**, 331, 1963.
5. BENESCH, R. y BENESCH, R. E.: *Nature*, **221**, 618, 1969.
6. BREWER, G. J. y EATON, J. W.: *Science*, **171**, 1205, 1971.
7. GREENWALD, I.: *J. Biol. Chem.*, **63**, 339, 1925.
8. GUIDI, E. E. y SCARO, J. L.: *Rev. esp. Fisiol.*, **26**, 151, 1970.
9. KENNEDY, A. C. y VALTIS, J. D.: *J. Clin. Invest.*, **33**, 1372, 1954.
10. LENFANT, C., WAYS, P., AUCUTT, C. y CRUZ, J.: *Respir. Physiol.*, **7**, 7, 1969.
11. LENFANT, C., TORRANCE, J. D., ENGLISH, E., FINCH, C. A., REYNAFARJE, C., RAMOS, J. y FAURA, J.: *J. Clin. Invest.* **47**, 2652, 1968.
12. OSKI, F. A. GOTTLIEB, A. J., MILLER, W. W. y DELIVOIRA-PAPADOPOULUS, M.: *J. Clin. Invest.*, **49**, 400, 1970.
13. RAPOPORT, S. y GUEST, G. M.: *J. Biol. Chem.*, **131**, 675, 1939.
14. ROUGHTON, F. J. V. y SCHOLANDER, P. F.: *J. Biol. Chem.*, **148**, 541, 1943.
15. SCHMIDT-NIELSEN, K. y LARIMER, L.: *Am. J. Physiol.*, **195**, 424, 1958.
16. SCHOLANDER, P. F.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 235, 1947.
17. SHAEFER, K. E., MESSIER, A. A. y MORGAN, C. C.: *Respir. Physiol.*, **10**, 299, 1970.
18. TORRANCE, J. D., LENFANT, C., CRUZ, J. y MARTICORENA, E.: *Respir. Physiol.*, **11**, 1, 1970-1971.

