

**METAHEMOGLOBINEMIA DE ALTURA
METAHEMOGLOBINA Y NADH DIAFORASAS**

J. Arnaud*, N. GUTIERREZ*,
J.C. QUILICI*, H. VERGNES**

* Instituto Boliviano de Biología de Altura - Facultad de Medicina - Casilla 641 La Paz Bolivia

** Centre d'hemotypologie du C. N.R.S. - C.H.U. Purpan, Avenue de Grande Bretagne 31352 Toulouse - France

INTRODUCCION

La hipoxia hipobárica de las grandes alturas (3.600 m.) produce al nivel del eritrocito, modificaciones bioquímicas, entre las cuales la elevación de la tasa de Meta-hemoglobina ha sido ya señalada (GOURDIN 8 - ARNAUD 1). En un trabajo precedente habíamos remarcado una relación entre el aumento de la tasa de Meta-hemoglobina (MetHb) y la disminución de la actividad enzimática de la NADH Diaphorasa en la altura (ARNAUD 2). Correlaciones similares han sido ya vislumbradas en los déficits de éste enzima (VERG

NES 14).

Sin embargo habíamos constatado también que en caso de necesidad, el eritrocito puede tener una tasa de Meta-hemoglobina mucho más baja que la normal de la altura (ARNAUD - 15). En ése trabajo hemos seguido la acción de la NADH - Diaphorasa frente a fuertes concentraciones de Meta-hemoglobina, a dos altitudes diferentes, sobre individuos del mismo origen.

MATERIAL Y METODOS

Hemos efectuado una serie de tests de BREWER (BREWER 3) sobre 25 aymaras (Indígenas -

originarios del Altiplano Andino) residentes en La Paz (3.600 m) y 25 aymaras residentes en Santa Cruz (450 m) (Bolivia).

En esta prueba, las muestras de sangre heparinada son metahemoglobinizadas completamente por el nitrato de sodio (0.18 N). Este oxidante penetra fácilmente en el eritrocito sin alterar la estructura de éste. Luego, los eritrocitos son lavados cuidadosamente con suero fisiológico e incubados a 37°C bajo agitación permanente. La solución de incubación está formada por los hematíes tratados en la forma indicada, tampón tris cátrico (0.075 M pH=8) y glucosa al 1%.

A etapas sucesivas, se mide la cantidad de metahemoglobina residual contenida en el incubado.

Por la diferencia de los datos hematológicos observados entre los sujetos estudiados, a causa de la altura, hemos expresado la tasa de Metahemoglobina en dos formas:

- Método usual: en % de hemoglobina total
- Nuestro método: en gramos de Metahemoglobina por 100 ml de sangre to

tal (por analogía con la expresión de la hemoglobina).

La tasa de MetHb ha sido determinada por el método de EVELYN-MALLOY (6) utilizando productos MERCK.

Los tiempos de la toma alícuotas del incubado han sido de: 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas y 7 horas después del inicio de la incubación.

RESULTADOS

Los resultados de los valores de las constantes hematológicas y de la MetHb están agrupados en la tabla I. Igualmente se han adjuntado los resultados del estudio de significación estadística realizado por medio del test de t de Student.

DISCUSION

La diferencia muy significativa observada en los datos hematológicos de los dos grupos de Aymaras (nivel de significación 0.1%) no hace más que confirmar una observación conocida por todos los hematólogos (CARRUTO 7, MOULIN 11), de ida al cambio de altura.

La tasa de MetHb contenida en la sangre de estos individuos es también significat

vamente diferente (nivel de significación 0,1%).

Si observamos los resultados de la MetHb residual en los dos grupos y en los diversos tiempos, se constata que:

- en el caso donde la Meta hemoglobina está expresada en g/100 ml de sangre total, los dos grupos son diferentes muy significativamente en todos los tiempos (nivel de significación 0,1%).

- por el contrario, si expresamos en porcentaje, vemos aparecer al tiempo $t = 3$ h, una diferencia no significativa al nivel de significación 5%, y al tiempo $t = 5$ h. una diferencia no significativa al nivel de significación 20%.

Esto explicaría nuestro interés por la expresión de los resultados en g/100 ml de sangre total; los porcentajes de hemoglobina total pueden enmascarar ciertos fenómenos cuando el grupo de individuos tiene contenido hemoglobínico muy diferente.

En la figura 1, hemos trazado la evolución de la tasa de MetHb residual en función

del tiempo de incubación. Sobre esas curvas se observan tres fases:

- de 0 a 2 horas: la pendiente de los segmentos de la recta entre 0 y 1 hora y de 1 h. a 2 h. es superior en los Aymaras de altura.

- de 2 a 3 horas: la pendiente de la recta que une esos puntos en los dos grupos de Aymaras, es sensiblemente igual.

- de 3 a 7 horas: la pendiente de la recta entre 3 a 5 h. y de 5 a 7 h. es superior en los Aymaras de tierras bajas.

Esto se traduce, al nivel de las curvas de evolución de la MetHb expresadas en porcentaje de hemoglobina total, por un aumento que se efectuaría hacia las 4 horas de incubación. Antes de este tiempo, la actividad NADH diaphorásica parece tener mayor efecto en los eritrocitos de los residentes de altura que en los de tierras bajas y volverse menos eficaz después de ese tiempo.

Así tenemos aquí la confirmación de una mayor gama de actividad de los sistemas oxidoreductores de los eritrocitos en residentes de la altura.

ra. De ahí a suponer una mayor sutileza que permita un -mejor control a las agresiones oxidantes por una parte, y a la posición de la curva -de disociación de la oxihemoglobina por otra, no hay mas que un paso que nos permitimos franquear.

En caso de un stress, éstos sistemas parecen más aptos para defender al eritrocito.

Por el contrario, la tasa de Methb puede ser fácilmente controlada. Teniendo su valor un rol en la posición de la curva de disociación de la oxihemoglobina (DARLING 4), su control parece más fácilmente realizable.

La regulación de la actividad de la NADH Diaphorasa -es poco conocida. En la altura el oxígeno puede tener su efecto actuando como efector. Además, el mismo sustrato: la Metahemoglobina, ó el producto : la hemoglobina, pueden jugar el rol de efectores allostéricos que explicaría ésta respuesta diferente.

Finalmente, es necesario no olvidar que la Diaphorasa no es el único poder reductor no descartable (SCOTT 13) : la Vitamina C, el glutatión

reducido.

Señalaremos solamente que el Glutathion ha sido encontrado significativamente más elevado en la altura (DELRUE 5, ARNAUD 2).

RESUMEN

La elevación de la tasa de Metahemoglobina en las grandes alturas, es una de las consecuencias de la modificación metabólica provocada por la hipoxia de altura que sufre el eritrocito.

Por el estudio de la evolución del test de BREWER en función del tiempo de incubación, se ha puesto en evidencia una diferencia muy significativa en la respuesta de los sistemas óxido-reductores eritrocitarios (principalmente la NADH Diaphorasa) entre la altura y las tierras bajas.

Estos sistemas presentan una sutileza de acción impor tante que les permite controlar mejor, por una parte, las agresiones oxidantes, y por otra, la posicion de la curva de disociación de la oxihemoglobina.

Tabla 1 - Test de t-Student
 MEDIDA DE LA MÉRITO MENSTRUAL DESPUES DE DIFERENTES
 TIEMPOS DE INCUBACION A 37°C
 ESTUDIO ESTADÍSTICO POR EL TEST DE STUDENT

	Médida expresada en % de ST			Médida expresada en g de Nucleo/100ml de ST			
	LA PAZ 3900 m. n = 5	estudio estadístico co-GE = 43 Test de Student	SANTA CRUZ 450 m. n = 25	LA PAZ 3500 m. n = 25	estudio estadístico GE = 42	SANTA CRUZ 450 m. n = 26	
St en %	51.120	10.310	41.320				
d	3.046	MED 0,1 %	3.648				
Mé en g/100 ml de ST	10.292	8.379	13.144				
d	1.253	MED 0,1 %	1.368				
Mé en %	3.346	12.186	1.522	0.56	12.370	0.20	
d	0.699	MED 0,1 %	0.609	0.14	MED 0,1 %	0.06	
MÉ DIA MÉ DIA MÉ DIA MÉ DIA	1 hora	78.58	4.658	89.16	18.77	3.366	10.93
	d	3.61	MED 0,1 %	3.70	1.16	MED 0,1 %	1.26
	2 horas	57.80	4.172	73.56	11.02	3.767	9.67
	d	5.04	MED 0,1 %	4.71	1.18	MED 0,1 %	1.35
	3 horas	41.93	2.058	63.72	10.07	3.605	8.66
	d	4.54	MED 5 %	6.50	1.30	MED 0,1 %	1.43
	5 horas	53.06	1.528	69.84	8.62	3.360	6.38
d	7.39	MED 20 %	7.56	4.30	MED 0,1 %	1.59	
7 horas	47.33	3.768	39.04	7.89	6.347	3.16	
d	7.48	MED 0,1 %	8.10	1.29	MED 0,1 %	1.36	

GE = grado de libertad = n + m - 2 por lo que en este caso = 30
 MED 0,1 % = muy significativamente diferente al nivel de 0,1 % cuando t = 3,393
 MED 1 % = significativamente diferente al nivel de 1 % cuando t = 2,695
 MED 5 % = no significativamente diferente al nivel de 5 % cuando t = 2,017
 MED 10 % = no significativamente diferente al nivel de 10 % cuando t = 1,661
 MED 20 % = no significativamente diferente al nivel de 20 % cuando t = 1,328

BIBLIOGRAFIA

1. ARNAUD J. - VERGNES H. - GUTIERREZ N. : Respiratory function and erythrocyte metabolism at high altitude. *Hemat. Latino-Americana*, 1976, T. 4 No. 22-23, 73/87.
2. ARNAUD J. - QUILLICI J.C. - VERGNES H. - GUTIERREZ N. : Methemoglobin and erythrocyte reducing systems in high altitude natives. (en edición)
3. BREWER G.J. - TARLOV A.R. - ALVING A.S. : Methemoglobin reduction test. A new sample in vitro test for identifying prima sensitivity. *Bull.Wod.Health - Org.*, 1960, 22, 633.
4. DARLING R.D. - ROUGHTON R.J.W. - The effect of methemoglobin on the equilibrium between oxygen and hemoglobin. *Amer. J. Physiol.* 1942, 137, 56.
5. DELRUE G. - VISCHER A. - BOUCKAERT J.P. - Modification du taux de glutathion sanguin durant le séjour a haute altitude. *C. R. Soc. Biol*, 1933, 113, 942
6. EVELYN K.A. - MALLOY H.T. : Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a simple sample of blood. *J.Biol.Chem.*, 1938, 126, 655.
7. GARRUTO R.M. : Polycythemia as adaptative response to chronic hypoxic stress. A thesis in anthropology-Doctor of Philosophy. The Pennsylvania State University-1973.
8. GOURDIN D. - VERGNES H. - GUTIERREZ N. : Methemoglobin in man living at high altitude. *Br.J.Hemat.* 1975, 29, 243.
9. KAPLAN J.C. : Les systemes d'oxydo-reduction du globule rouge et leurs anomalies. *Nouv.Rev.Fran Hemat.*, 1966, 6, 809.
10. KAPLAN J.C. : Diaphorases et glutathion réductases erythrocytaires. *Exposés Ann.Bioch.Med.* 1969.
11. MOULIN J. : Hematimetrie et cytologie en milieu tro

- pical de l'Amérique du Sud. Variations raciales et ecologiques. These de Doctorat d'Université - Université Paul Sabatier-Toulouse-France-1971
- 12 RUFFIE J. - VERGNES H. - HOBBE TH. : Sur la réversibilité de la methemoglobinisation des hématies chez les populations indigènes du corridor interandin. Essai d'interprétation. C.R.Acad.Sci. 1966, 262.
- 13 SCOTT E.M. : Congenital methemoglobinemia due to DPNH Diaphorase deficiency, Hereditary disorders of erythrocyte metabolism Edited by Beutler E.-Grune and Stratton-New York and London- 1968, 102, 113.
- 14 VERGNES H. - GHERARDI M. BERNARDET P. - BIERME R. Déficit familial en NADH Diaphorase. Nouv.Rev.Fran Hémat., vol. 12, No. 4, 1.972, 560/562.
- 15 ARNAUD J. : Trabajos no publicados aún.