



Metahemoglobinemia de altura. Metahemoglobina y NADH diaforasas

Jacques ARNAUD, Nancy GUTIERREZ,
Jean-Claude QUILICI, Henri VERGNES

**Metahemoglobinemia de altura.
Metahemoglobina y NADH diaforasas**

Jacques ARNAUD, Nancy GUTIERREZ,
Jean-Claude QUILICI, Henri VERGNES

Metahemoglobinemia de altura. Metahemoglobina y NADH diaforasas

Jacques ARNAUD**, Nancy GUTIERREZ*, Jean-Claude QUILICI*, Henri VERGNES**

Sangre, 27 (2): 150-155, 1982

Arnaud, J.; Gutiérrez, N.; Quilici, J.C.; Vergnes, H.

METAHEMOGLOBINEMIA DE ALTURA, METAHEMOGLOBINA Y NADH DIAFORASAS. (*High altitude methaemoglobinaemia, Methaemoglobin and NADH Diaphorase*).

The increase of methaemoglobin at high altitude is one the consequences of the charge of metabolism of the erythrocyte caused by high altitude hypoxia.

A significant difference has been demonstrated between highland and lowland natives in the response of the erythrocytic oxygen reduction systems to hypoxia (mainly the NADH diaphorase) by using the Brewer test a function of incubation time.

These systems thus show the capacity for fine control of the effects of oxidation as well as regulation of the position of the O₂-Hb-dissociation curve.

Reprints: J. Arnaud, Centre d'Hématologie du CNRS. CHU Purpan, 31300 Toulouse, France.

INTRODUCCION

La hipoxia hipobárica de las grandes alturas (> 3000 m) produce al nivel del eritrocito modificaciones bioquímicas, entre las cuales la elevación de la tasa de metahemoglobina ha sido ya señalada (1, 9). En un trabajo precedente habíamos destacado una relación entre el aumento de la tasa de metahemoglobina (MetHb) y la disminución de la actividad enzimática de la NADH Diaphorasa en la altura (2). Correlaciones similares han sido ya vislumbradas en los déficits de esta enzima (15).

Sin embargo, hemos constatado también que en caso de necesidad, el eritrocito puede tener una tasa de Metahemoglobina mucho más baja que la normal de la altura (3). En ese trabajo hemos seguido la acción de la NADH Diaphorasa frente a fuertes concentraciones de Metahemoglobina a dos altitudes diferentes, sobre individuos del mismo origen.

MATERIAL Y METODOS

Se efectuaron una serie de "tests" de Brewer modificados (4), sobre 25 Aymaras (indígenas originarios del Altiplano Andina) residentes en La Paz (3600 m) y 25 Aymaras residentes en Santa Cruz (450 m) (Bolivia).

En esta prueba, las muestras de sangre heparinizada (0,5 ml) son metahemoglobinizadas completamente por el Nitrato de Sodio (1 ml - 0,18 N), en incubación durante 30 minutos a 37°C bajo agitación permanente. A continuación los eritrocitos son lavados cuidadosamente con suero fisiológico.

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

** Centre d'Hématologie du CNRS. CHU Purpan, avenue de Grande Bretagne. 31300 Toulouse. France.

lógico frío (5 veces 5 ml centrifugado 10 minutos a 3.000 rpm), e incubados a 37°C bajo agitación permanente. La solución de incubación está formada por 0,2 ml de hematíes tratados en la forma indicada (corrigiendo el volumen en función del valor del recuento eritrocitario), 2 ml de tampón Tris-Cítrico (0,075 M - pH = 8) y 1 ml de Glucosa al 1 por ciento.

Así es incubado un número idéntico de glóbulos rojos. Sin embargo, para evitar variaciones debido a posibles macro o microcitosis, hemos efectuado en el día un hemograma completo para eliminar toda anomalía. En el caso en que de éstas se presentara, los resultados correspondientes son eliminados.

A etapas sucesivas se mide la cantidad de Metahemoglobina residual contenida en el incubado (10).

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 tanto por ciento de la hemoglobina total.
- Nuestro método: en gramos de Metahemoglobina por 100 ml de sangre total (por analogía con la expresión de la hemoglobina).

La tasa de MetHb ha sido determinada por el método de Evelyn-Malloy (7).

Los tiempos de la toma de partes 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 las constantes hematológicas y de la MetHb están agrupados en el cuadro I. Igualmente se consignan los resultados del estudio de significación estadística realizado por medio del "test" t de Student.

DISCUSION

La diferencia muy significativa observada en los datos hematológicos de los dos grupos de Aymaras (nivel de significación 0,1 por ciento) no hace más que confirmar una observación conocida por todos los hematólogos (8, 12), debida al cambio de altura.

La tasa de MetHb contenida en la sangre de estos individuos es también significativamente diferente (nivel de significación 0,1 por ciento).

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 MetHb está expresada en gm/100 ml de sangre total, los dos grupos son muy significativamente diferentes en todos los tiempos (nivel de significación 0,1 por ciento).

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

Esto explicaría nuestro interés por la expresión de los resultados en gm/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 a 2 horas es superior en los Aymaras de Altura.

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

CUADRO I
TEST DE BREWER
MEDIDA DE LA MetHb RESIDUAL DESPUES DE DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION A 37°C
Estudio estadístico por el "test" de "t" de Student.

	MetHb expresada en % de Hb			MetHb expresada en g de MetHb/100 ml de ST		
	La Paz 3600 m n = 25	Estudio estadístico GLD = 48 "Test" de Student	Santa Cruz 450 m n = 25	La Paz 3600 m n = 25	Estudio estadístico GLD = 48	Santa Cruz 450 m n = 25
Ht. en % x.	51,120	10,310	41,320			
D.S.	3,046	MSD	3,648			
Hb en g°/o ml de ST x	16,252	8,379	13,144			
D.S.	1,253	MSD	1,368			
MetHb x.	3,544	12,164	1,522	0,58	12,370	0,20
D.S.	0,699	MSD	0,449	0,14	MSD	0,06
MetHb residual 1 hora x	78,58	4,458	83,18	12,77	5,364	10,93
D.S.	3,61	MSD	3,70	1,16	MSD	1,26
MetHb residual 2 horas x	57,80	4,172	73,56	11,02	3,767	9,67
D.S.	5,04	MSD	4,71	1,18	MSD	1,35
MetHb residual 3 horas x	61,93	2,052	65,72	10,07	3,605	8,66
D.S.	6,54	NSD	6,50	1,30	MSD	1,45
MetHb residual 5 horas x	53,06	1,525	49,84	8,62	5,360	6,58
D.S.	7,39	NSD	7,56	1,30	MSD	1,39
MetHb residual 7 horas x	47,35	3,768	39,04	7,69	6,747	5,16
D.S.	7,48	MSD	8,10	1,29	MSD	1,36

GDL: Grado de libertad. $n^1 + n_2 - 2$ porque n_1 y $n_2 < 30$

MSD: $p < 0,1$ %: muy significativamente diferente. $t > 3,533$

SD: $p < 1$ %: significativamente diferente. $3,533 > t > 2,695$

NSD: $p > 5$ %: no significativamente diferente. $t < 2,695$

— De 3 a 7 horas: la pendiente de la recta entre 3 y 5 horas y de 5 a 7 horas 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 de la Metahemoglobina residual en los eritrocitos de los residentes en tierras bajas, que se efectuaria hacia las 4 horas de incubación. Antes de este tiempo, la actividad NADH Diasphorásica parece tener mayor efecto en los eritrocitos de los residentes de altura que en los de tierras bajas, y volverse menos eficaz después de este tiempo.

Estos resultados apoyan la existencia de una mayor actividad de los sistemas óxido-reductores de los eritrocitos en residentes de la altura (13). Por ello suponemos una mayor elasticidad en los sistemas óxido-reductores que permitiría un mejor control, por una parte, de las agresiones oxidantes, y por otra parte de la posición de la curva de disociación de la oxihemoglobina, no hay más que un paso que nosotros nos hemos permitido franquear.

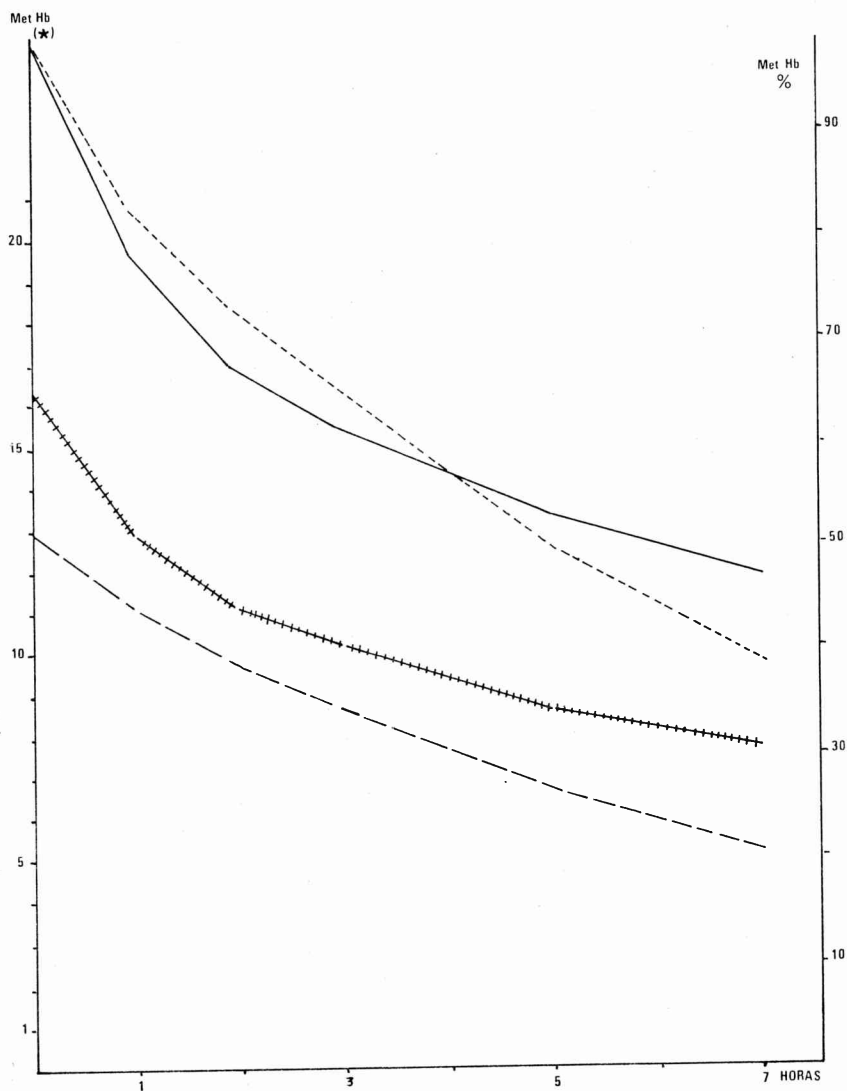


Figura 1.— Curvas de evolución de la metahemoglobina residual en función del tiempo de incubación en dos alturas diferentes

—————	: MetHb en %	La Paz (3600 m)
- + + + + +	: MetHb en g°/o ml sangre total	
-----	: MetHb en %	Santa Cruz (450 m)
—————	: MetHb en g°/o ml sangre total	

(*) en g °/o ml sangre total.

En caso de un "stress" oxidante fuerte, estos sistemas parecen más aptos para defender al eritrocito.

Por el contrario, la tasa de MetHb puede ser fácilmente controlada. Teniendo su valor un papel en la posición de la curva de disociación de la oxihemoglobina (5), 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 (11).

Además, el mismo sustrato, la Metahemoglobina, o el producto, la hemoglobina, pueden desempeñar el papel de efectores alostéricos que explicaría esta respuesta diferente. La cinética de la reducción de la Metahemoglobina en hemoglobina parece corresponder a una reacción de orden uno (proceso dependiente de la concentración de la MetHb):

$$-\frac{d(\text{MetHb})}{dt} = k(\text{MetHb})$$

Finalmente, es necesario recordar que no sólo la Diaphorasa reduce la Methemoglobina, sino que existen otras moléculas que tienen un poder reductor no descartable (14): La Vitamina C y el Glutation Reducido.

Señalaremos solamente que el Glutation ha sido encontrado significativamente más elevado en la altura (2, 6).

Agradecimiento:

Este trabajo realizado en el Instituto Boliviano de Biología de Altura, ha sido financiado en parte por el C.N.R.S. de Francia, por intermedio de:

- el ATP: Dynamique des Populations - Programme 1317
- la RCP293 - Anthropologie des Populations Andines.

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 importante que les permite controlar mejor, por una parte, las agresiones oxidantes, y por otra, la posición de la curva de disociación de la hemoglobina.

REFERENCIAS

1. Arnaud, J.; Vergnes, H.; Gutiérrez, N.: "Fonction respiratoire et métabolismes erythrocytaires en haute altitude". In: "Anthropologie des populations andines". Inserm, 63: 505, 1976.
2. Arnaud, J.; Quilici, J.C.; Gutiérrez, N.; Beard, J.; Vergnes, H.: "Methemoglobin and erythrocyte reducing systems in high altitude natives". Ann. Human Biology, 6, 6: 585, 1979.
3. Arnaud, J.; Gutiérrez, N.; Vargas, E.; Vergnes, H.: "Metahemoglobinemia de altura. Metahemoglobina: reserva de hemoglobina". Hematología (México), 25-26, VII: 9, 1979.
4. Brewer, G.J.; Tarlov, A.R.; Alving, A.S.: "Methemoglobin reduction test. A new simple in vitro test for identifying prime sensitivity". Bull. Wld. Hlth. Org., 22: 633, 1960.
5. Darling, R.C.; Roughton, F.J.W.: "The effect of methemoglobin on the equilibrium between oxygen and hemoglobin". Am. J. Physiol., 137: 56, 1942.
6. Delrue, G.; Vischer, A.; Bouckaert, J.P.: "Modification du taux de glutathion sanguin durant le séjour à haute altitude". C.R. Seanc. Soc. Biol., 113: 942, 1933.
7. Evelyn, K.A.; Malloy, H.T.: "Microdetermination of oxyhemoglobin; methemoglobin and sulfhemoglobin in a simple sample of blood". J. Biol. Chem., 126: 655, 1938.

8. Garruto, R.M.: "Polycythemia as adaptative response to chronic hypoxic stress". A thesis in Anthropology-Doctor of Phylosophy. The Pennsylvania State University, 1973.
9. Gourdin, D.; Vergnes, H.; Gutiérrez, N.: "Methaemoglobin in man living at high altitude". Br. J. Haemat., 29: 243, 1975.
10. Kaplan, J.C.: "Les systèmes d'oxydo-réduction du globule rouge et leurs anomalies". N.R.F. Hémat., 6, 6: 809, 1966.
11. Kaplan, J.C.: "Diasphorases et Glutathion reductase erythrocytaires". Exposés A. Biochim. med., 29: 77, 1969.
12. Moulin, J.: "Hématimétrie et cytologie en milieu tropical de l'Amérique du Sud. Variations raciales et écologiques". Thèse de Doctorat d'Université. Université Paul Sabatier, Toulouse (France), 1971.
13. Ruffie, J.; Vergnes, H.; Hobbe, Th.: "Sur la reversibilité de la methémoglobinisation des hématies chez les populations indigènes du corridor interandin. Essai d'interprétation". C.R. Acad. Sci. Paris (série D), 262: 1956, 1966.
14. Scott, E.M.: "Congenital methemoglobinemia due to DPNH Diaphorase deficiency. Hereditary disorders or erythrocyte metabolism". Edited by Beutler, E. Grune & Stratton, New York and London, 102: 113, 1968.
15. Vergnes, H.; Gherardi, M.; Bernardet, P.; Bierme, R.: "Deficit familial en NADH Diaphorase". N.R.F. Hemat. 12, 4: 560, 1972.