

DIFERENCIACION DE HEMOGLOBINAS HUMANAS EN LAS GRANDES ALTURAS

I.— Hemoglobina fetal en recién nacidos y en adultos

Drs.: HUMBERTO ASTE-SALAZAR y CARLOS L. KRUMDIECK B. (*)

Instituto de Investigaciones de la Altura y Departamento de Ciencias Fisiológicas, Universidad Peruana "Coyetano Heredia", Lima - Perú.

Aunque hay muchos puntos de similitud entre las hemoglobinas humanas adulta (Hb A, $\alpha_2\beta_2$) y fetal (Hb F, $\alpha_2\gamma_2$), ésta es estructuralmente disimilar a aquélla; ambos pigmentos contienen idénticos grupos hemo-pero diferentes globinas. Un aspecto de las diferencias estructurales entre los dos pigmentos es lo que demostraron Korber (1866) y Krüger (1888), que la hemoglobina adulta normal se desnaturaliza más rápidamente que la hemoglobina fetal normal en un medio alcalino. Las diferencias inmunológicas de ambas hemoglobinas humanas normales, adulta y fetal, se conocen desde hace tiempo.

La hemoglobina fetal se produce en el feto humano y es la forma predominante durante la vida pre-natal. Al nacer, ella constituye el 55-98% de la hemoglobina del recién nacido. El tiempo de desaparición de la hemoglobina fetal en la vida post-natal aún no ha sido definitivamente determinado; algunos señalan que su remplazo por la hemoglobina adulta es completa o casi completa en la mayoría de los niños al fin del primer año de la vida post-natal. La hemoglobina adulta aparece en la sangre fetal tempranamente en la vida pre-natal, y es el único tipo de hemoglobina presente en la gran mayoría de los adultos normales (1).

Varios autores sugieren que una hemoglobina semejante a la fetal está presente en la sangre de los sujetos adultos normales. Singer y col. (1951) (2)

(*) Este trabajo fue empezado en 1957 cuando los autores eran miembros del Instituto de Biología Andina, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y terminado como miembros del Instituto de Investigaciones de la Altura, Universidad Peruana de Ciencias Médicas y Biológicas.

Este estudio fue ayudado en parte por un contrato con los Fuerzas Aéreas de USA.

con su método de "1 minuto-residuo" determinaron el porcentaje de hemoglobina desnaturalizada dentro de un minuto y establecieron que muy pequeñas cantidades, del 0.5 al 1.7%, de pigmento resistente, pueden aún ser demostradas en los adultos normales. Roche y Derrien (citados por Chernoff) (3) con estudios de solubilidad sugieren la presencia de la hemoglobina fetal o de una semejante a ella en los sujetos adultos. Chernoff (1953) (3) empleando un método inmunológico encontró en las muestras de sangre de adultos normales proporciones de hemoglobina fetal del 0.05 al 1.0%. Huisman y col. (1955) (citados por Beaven y asoc.) (4) determinando la cantidad de isoleucina en el residuo alcalino de la sangre de adultos normales encontraron valores de 0.3-0.4% de hemoglobina fetal.

La actividad eritropoyética es estimulada por la exposición del sujeto a una tensión baja de oxígeno, y frecuentemente se ha señalado la analogía entre esta situación y la producción de los eritrocitos fetales.

Walker y col. (1955) (5) señalan que el aumento de la hemoglobina adulta acompañó al crecimiento y maduración de los fetos bajo condiciones de oxigenación óptima, mientras que la hipoxia facilitó la continuada producción preferencial de la hemoglobina fetal.

Rubowitz (6) señaló que la hemoglobina de los hombres y la de los animales en la altura difieren cataforéticamente de las correspondientes al nivel del mar, y sugirió que en los residentes en las grandes alturas la hipoxia puede estimular la formación de la hemoglobina fetal (7).

White y Beaven (7) y Beaven y asoc. (1960) (4) no encontraron persistencia anormal de hemoglobina fetal en niños con cardiopatía congénita cianótica.

White y Beaven (1954) (8) y Beaven y col. (4) indican que los estudios de una pequeña serie de policitemias primarias y secundarias no dieron evidencia de hemoglobina fetal.

Chernoff (1955) (9) expresa que tal vez el mecanismo de producción de la hemoglobina fetal "está siempre presente, pero normalmente su expresividad es interferida ya sea por otros tipos de hemoglobina o por modificadores genéticos, de modo que sólo mínimas cantidades se producen".

Singer y col. (1951) (2), e Itano (1953) (1) señalan que la presencia de hemoglobina fetal después de la infancia, puede considerarse como "evidencia de una continuación o de una reactivación de un mecanismo esencialmente embrionario, en compensación a un bloqueo de la síntesis de la hemoglobina

adulto y en los desórdenes en los cuales la médula ósea está bajo la acción de un stress prolongado, severo o crónico".

La concentración de la hemoglobina fetal aumenta en la sangre, bajo varias condiciones fisiológicas y patológicas; una elevación de la hemoglobina fetal no siempre es manifestación de enfermedad.

Edington y Lehmann (1955) (10) fueron los primeros en llamar la atención sobre ciertos individuos de Africa, en cuya sangre se encontraba Hb S y Hb F y no presentaban los hechos clínicos observados en la anemia falciforme.

Posteriormente, en estudios realizados en varias generaciones de familias de negros, Went y McIver (1958) (11), Jacob y Raper (1958) (12), Herman Jr. y Conley (1960) (13), Thompson y asoc. (1961) (14), Olivia y Myerson (1961) (15), Wheeler y Krevans (1961) (16), Schroeder y col. (1962) (17), Conley y asoc. (1963) (18) precisaron que la hemoglobina fetal puede persistir en la vida adulta como una manifestación de una anomalía benigna hereditaria de la síntesis de la hemoglobina, para la cual Jacob y Raper (12) sugirieron el nombre de "persistencia hereditaria benigna de la Hb F". El resultado de esta anomalía determinada genéticamente y atribuible a un solo factor genético autosomal, fue la persistencia de la Hb F en elevada concentración en los eritrocitos sin estar asociada a manifestaciones clínicas o a anomalías hematológicas. Esta anomalía congénita debe ser diferenciada de otros desórdenes, en los cuales la Hb F puede persistir en la vida adulta. Las investigaciones estructurales de la fracción hemoglobina en los individuos con persistencia de Hb F, rinden evidencia de que ese componente es idéntico con la Hb de la sangre del cordón umbilical del recién nacido.

McCormick y Walker (1960) (19), como resultado de sus observaciones, consideran que hay varias hemoglobina alcali-resistentes a las cuales llaman "hemoglobinas fetales normales".

El propósito de este trabajo ha sido investigar si la hipoxia crónica en que vive el nativo de las grandes alturas y en particular el recién nacido, determinan una aumentada concentración de hemoglobina fetal.

MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo sólo nos interesamos en la Hb F normal, como sustancia homogénea, y en su desnaturalización alcalina. Para el estudio de la Hb F en el adulto se obtuvo sangre venosa, empleando como anticoagulante

solución de heparina, o de ACD u oxalato de sodio en polvo, de los siguientes sujetos:

- a) Lima (150 metros o 495 pies sobre el nivel del mar, presión barométrica promedio 752 mm.Hg.), edades 17-50 años, adultos normales blancos y mestizos;
- b) Morococha (4,540 metros o 14,982 p.s.n.m., pB promedio 446 mm.Hg.), edades 17-42 años, adultos normales nativos indios o mestizos, adultos nativos con soroche crónico (Enfermedad de Monge); y
- c) Ticlio (4,826 metros o 15,926 p.s.n.m., pB promedio 431 mm.Hg.), edades 19-60 años, adultos normales nativos indios o mestizos, y adultos nativos con soroche crónico. En este lugar también se estudiaron residentes blancos o mestizos originarios del nivel del mar con más de un año de permanencia. Con la designación de nativos comprendemos a sujetos nacidos y viviendo en el lugar o en lugares vecinos cercanos con residencia mayor de un año.

Todos los sujetos de la altura eran periódicamente examinados por los médicos de las zonas mineras donde trabajaban (el trabajo era realizado dentro de las minas o en la superficie). Muchos de los sujetos estudiados en Ticlio trabajan diariamente a 5,100 metros o 16,830 p.s.n.m.

Para el estudio de la hemoglobina fetal en el recién nacido, se obtuvo simultáneamente sangre venosa de la madre y sangre del cordón umbilical del recién nacido inmediatamente después del parto, empleando los mismos anticoagulantes que para la sangre de los adultos, en los siguientes lugares: a) Lima, b) Oroya (3,726 metros o 12,296 p.s.n.m., pB promedio 490 mm.Hg.), c) Morococha, y d) Ticlio. Las madres eran nativas de los correspondientes lugares.

Las muestras de sangre de la altura fueron colectadas temprano en la mañana, de muchos de los sujetos 3 a 5 horas después del desayuno; eran transportadas en frascos conteniendo hielo, llegando a Lima 3 a 5 horas después de extraídas. Las muestras de sangre materna y de cordón umbilical de Lima fueron obtenidas en el Hospital de Maternidad.

Para determinar la concentración de la hemoglobina en la sangre total se usó el colorímetro fotoeléctrico de Evelyn, calibrado con el método gasométrico de Van Slyke-Neill.

El procedimiento para el aislamiento de la hemoglobina fue muy similar a aquel de Drabkin (21), excepto que la Hb no fue cristalizado. Los hematíes fueron lavados con solución salina al 1.2%. Se conservó el hemolisado en refrigeración. La "proporción de desnaturalización alcalina" fue determinada con el método de Betke (22), modificado ligeramente. La solución de Hb para la desnaturalización alcalina fue preparada del hemolisado original, para obtener una concentración de 0.12 gr./100 ml. de agua bidestilada; esta solución se centrifugó a alta velocidad (19,000 r.p.m., a 0° durante 20 minutos) previamente a la adición del álcali. Se empleó una solución alcalina de 2N NaOH, pH 12.5 —12.6.

La conversión de la oxihemoglobina en hematina alcalina fue seguida absorcionalmente a la temperatura del cuarto, en un espectrofotómetro Coleman Senior Modelo 14 Universal, a intervalos de 10 segundos el primer minuto luego cada 30 segundos, empleando longitud de onda 540 m μ y un blanco de agua bidestilada.

Los "porcentajes de oxihemoglobina no desnaturalizada" se marcaron en papel semilogarítmico contra "el tiempo" como abscisa. Se empleó el método de desnaturalización alcalina "1 minuto-residuo" de Singer y col. (2), usándose para las lecturas un espectrofotómetro de Beckman modelo DU. Especial cuidado se tuvo en el control de la temperatura y del pH de la solución alcalina empleada, ya que ambos factores influyen en la proporción de la desnaturalización alcalina. Las determinaciones de "proporción de desnaturalización alcalina" se efectuaron 24 horas después de llegar la sangre a Lima. Para asegurarnos de la estabilidad de las soluciones de oxihemoglobina, especialmente de la ausencia de metahemoglobina, el espectro de absorción visible de la oxihemoglobina fue determinado usándose un espectrofotómetro Beckman Modelo DU.

RESULTADOS

Valores de hemoglobina sanguínea en sujetos adultos normales a diferentes alturas.

En el Cuadro I presentamos los valores que hemos hallado para la concentración de la Hb a nivel del mar y a diferentes alturas.

Los resultados mostrados coinciden con los obtenidos en similares alturas por Hurtado y asoc. (23), y señalan un aumento considerable de la Hb, que tiene relación directa con la altura; se observa además, clara diferencia entre los sexos, siendo menor en mujeres tal como ocurre a nivel del mar.

CUADRO I

HEMOGLOBINA, GRS./100 ML. SANGRE EN ADULTOS NORMALES, SEGUN ALTITUD

| | LIMA (495 p.s.n.m.) Nativos | MOROCOCHA (14,982 p.s.n.m.) Nativos | TICLIO (15,926 p.s.n.m.) Nativos normales | |
|------------------|-----------------------------------|---|---|------------------|
| | Normales | Normales | Hombres | Mujeres |
| Sujetos | 33 | 22 | 107 | 6 |
| HEMOGLOBINA: | | | | |
| Media \pm E.S. | 15.2 \pm 0.15 | 19.7 \pm 0.49 | 20.87 \pm 0.22 | 17.95 \pm 0.50 |
| D.S. | 0.91 | 2.30 | 2.35 | 1.22 |

"Proporción de desnaturalización alcalina"

En la Figura 1 - sección izquierda, se muestra la representación lineal de los valores promedio de nuestras observaciones en Lima (32 hombres adultos nativos normales) y en Ticlio (38 hombres adultos nativos normales) por representar el mayor número de observaciones y corresponder a las alturas más extremas estudiadas.

Estas representaciones lineales de empinada inclinación dan un promedio de tiempo de reacción-medio, es decir, para el 50% de conversión de 12.2 ± 0.52 segundos para Lima y de 11.8 ± 2.37 segundos para Ticlio, a la temperatura ambiente ($20^{\circ} 0 \pm 2^{\circ} 0$ C). Estos valores son estrechamente semejantes al logrado por Beaven y col. (1960) (24) de 11.0 ± 2.0 segundos a la temperatura ambiente ($20^{\circ} 0 \pm 2^{\circ} 0$ C) para 222 muestras de sangre de sujetos normales a nivel del mar. Aparentemente en 1.30 — 2.00 minutos, la reacción de desnaturalización fue casi completa. A partir del 5% de hemoglobina no modificada, el método no mostró la sensibilidad requerida, rindiendo valores muy irregulares en cierto número de muestras.

La "proporción de desnaturalización alcalina" se siguió a una longitud de onda de 540 m μ . Huisman (1959) (25) señala que el "método espectrofotométrico a longitud de onda de 650 m μ (Brinkman y Jonxis, 1935, Beaven y asoc., 1951) tiene la desventaja que los porcentajes bajos de Hb F, debajo del 10%, no pueden ser medidos con seguridad, mientras que a 576 m μ

PROPORCION DE DESNATURALIZACION ALCALINA

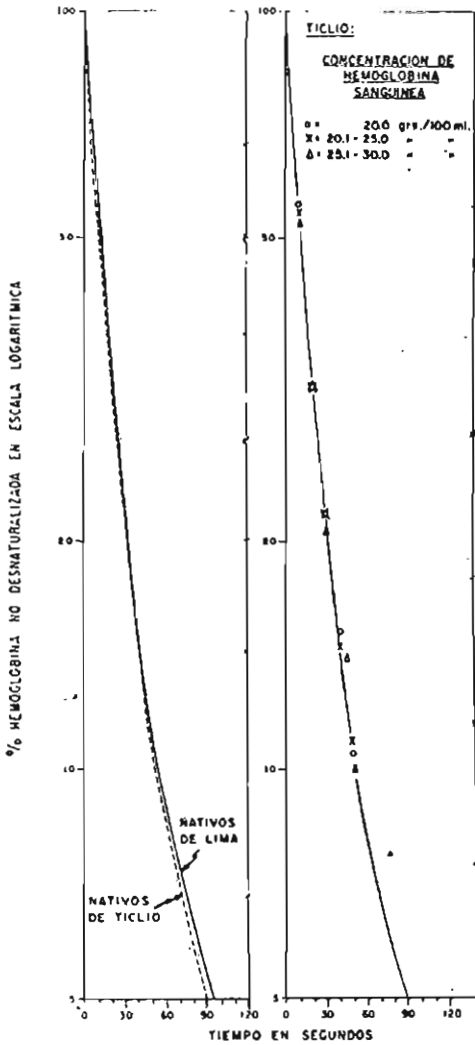


Fig. 1

PROPORCION DE DESNATURALIZACION ALCALINA

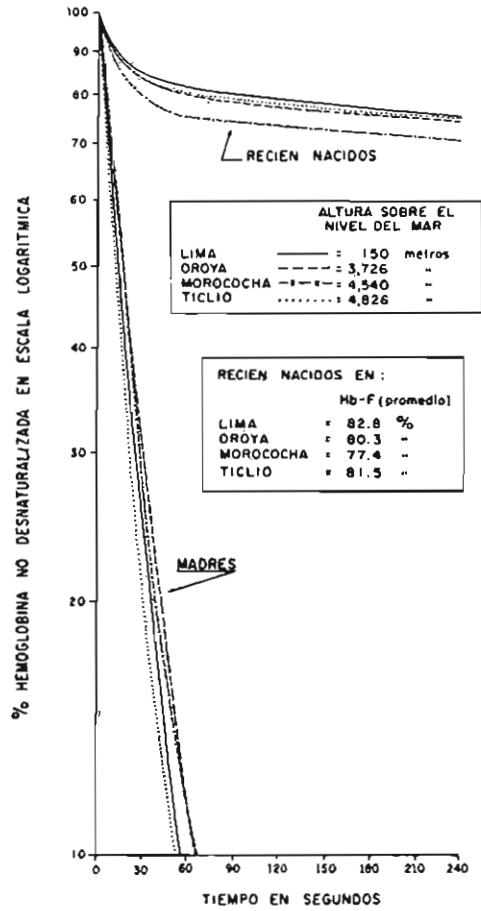


Fig. 2

(Jonxis y Visser, 1956) (51) es posible estimar los porcentajes bajos de Hb F con una razonable seguridad".

Se calculó la inclinación de las representaciones lineales de "proporción de desnaturalización alcalina", rindiendo para Lima un ángulo de $132^{\circ}33'$, con la ecuación $Y = 791.7 X^{-1.089}$, y para Tíclio un ángulo de $126^{\circ}20'$, con la ecuación $Y = 2,147.6 X^{-1.8590}$. El análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre los valores de las medias de Lima y Tíclio.

En la Figura 1 - sección derecha, se muestra la no influencia de la concentración de hemoglobina sanguínea, en la inclinación de la representación lineal promedio de "proporción de desnaturalización alcalina" de los nativos aparentemente normales de Tíclio.

La representación lineal promedio de la "proporción de desnaturalización alcalina" de los "residentes normales" en Tíclio, la de los "nativos normales" y "nativos con soroche crónico" en Morococha caen a la derecha de la de Lima.

Se observó que los diferentes anticoagulantes empleados (heparina, ACD, oxalato de Na) no influyeron en la velocidad ni en la inclinación de la "proporción de desnaturalización alcalina".

"1 minuto-residuo"

En el Cuadro II se muestran los porcentajes de Hb F encontrados en los sujetos estudiados en Lima y en Tíclio; el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los valores de las medias en ambos lugares. Entre

CUADRO II
HEMOGLOBINA FETAL EN ADULTOS NORMALES, SEGUN ALTITUD

| | (%) (Método de Singer y col.) | |
|------------------|--------------------------------|-----------------|
| | Lima | Tíclio |
| Sujetos | 16 | 113 |
| Media \pm E.S. | 1.21 \pm 0.16 | 1.41 \pm 0.07 |
| D.S. | 0.67 | 0.74 |
| Valor. Extrem. | 0.46 - 2.60 | 0.30 - 4.78 |
| "p" | < 0.3 | |

los sujetos de Ticlio están incluidos algunos con soroche crónico. De los 113 sujetos estudiados, 21 (18.6%) presentaron el valor "1 minuto-residuo" mayor del 2.0%, valor considerado por Singer y col. (2) fuera del rango de normalidad en sujetos a nivel del mar: 2.01-3.00 en 18 sujetos, 3.01-4.00 en 2, y 4.01-5.00 en 1. Los valores mayores del 2.0% de "1 minuto-residuo" no tenían relación con la concentración de hemoglobina total, ni con el origen, edad, ocupación, tiempo de residencia, ni con el soroche crónico.

Binomio "madre-recién nacido"

A.— Madres en el momento del parto: Figura 2.

1.— "Proporción de desnaturalización alcalina": las representaciones lineales resultantes se muestran en la Figura 2. Se puede observar que el aspecto, inclinación y posición de ellas, en las diferentes alturas, son exactamente semejantes a las observadas en los hombres adultos normales (Figura 1 - sección izquierda).

Es interesante observar que se repite el mismo sentido de posición de las representaciones lineales en las diferentes alturas con respecto a la de Lima.

El análisis estadístico de los valores de las medias de estas representaciones lineales, no mostró diferencias significativas.

2.— "1 minuto-residuo": lamentablemente en muy pocas madres se determinó, el valor obtenido fluctó de 0.22 a 1.57%. En un pequeño grupo de mujeres normales no embarazadas en Lima, encontramos una media de $0.59 \pm 0.02\%$ y en Ticlio $1.69 \pm 0.40\%$.

Una madre de Ticlio (18 años de edad) con una concentración de hemoglobina circulante de 9.2 gr./100 ml. en el momento del parto (gran anemia para tal altura, ya que la cifra media de Hb que hemos hallado en mujeres nativas normales no embarazadas en Ticlio es 17.95 ± 0.50 gr./100 ml.), mostró un valor de hemoglobina fetal de 3.4% (no fue posible determinar la "proporción de desnaturalización alcalina", por deterioro de la muestra de sangre). El recién nacido de esta madre pesó 3,000 grs. y su cifra de Hb era 16.1 gr./100 ml. en la sangre del cordón en el momento del parto.

Ricknagel y Chernoff (1955) (26) empleando una prueba inmunológica sensible de precipitación cuantitativa, en 10 de 91 gestantes estudiadas encontraron significativos cambios en el contenido de Hb F de los hematíes circulantes. El más alto valor prepartum de Hb F fue 1.37% en el último trimes-

tre. Consideraron como más probable que la Hb F encontrada fue producida por la madre en respuesta al stress del embarazo (cambios hormonales). Beaven y asoc. (1960 (4), con "su método combinado", no encontraron Hb F en 21 mujeres embarazadas, y consideraron que la presencia de Hb F en el último período del embarazo es de significación patológica. Así pensamos frente a los valores encontrados por Aguado Flores y col. (1965) (47) de Hb F en parturientas (sangre venosa) en Ciudad de México (2,240 metros s.n.m.): media 3.1% y valores extremos 0.55-21.0%.

B.— Recién nacido

1.— "Proporción de desnaturalización alcalina", las curvas resultantes se muestran en la Figura 2 con su aspecto característico: una parte sensible a la desnaturalización y otra parte resistente. El promedio de los porcentajes de Hb F obtenidos en sangre fetal de Oroya, Morococha y Ticlio, así como el grupo de control de Lima se presentan en el Cuadro III.

CUADRO III
HEMOGLOBINA FETAL EN RECIÉN NACIDOS, SEGUN ALTITUD
(MÉTODO DE BETKE)

| | Altura en pies | Nº | % |
|-----------|----------------|----|------|
| Lima | 495 | 14 | 82.8 |
| Oroya | 12,296 | 15 | 80.3 |
| Morococha | 14,982 | 12 | 77.4 |
| Ticlio | 15,926 | 6 | 81.5 |

Estos valores caen dentro de los señalados por otros autores como normales al nivel del mar.

Observando la posición de las curvas, impresiona como que a mayor altura la inclinación de ellas va cambiando, haciéndose menos horizontal, ya que el valor promedio de la Hb F va disminuyendo. Pero la curva correspondiente a Ticlio rompe esa tendencia y, una vez más, su posición es muy próxima a la curva de Lima.

La diferencia entre los valores de las medias de las curvas no fue estadísticamente significativa.

CUADRO IV
Hb. y Hb FETAL EN MADRES Y RECIEN NACIDOS

| | Edad, años | Hemoglobina, grs./100 ml. sang. venosa materna | Peso, R.N. grs. | Hemoglobina, grs./100 ml. sang. cordón umbilical | Desnaturalización alcalina Método Belke Hb F, % | Método Singer Hb F, % |
|---------------------------------|-----------------|---|--------------------------|---|---|--------------------------|
| LIMA | | | | | | |
| (495 p.s.n.m.) 14 sujetos | 23.8 16 - 39 | 12.2 8.8 - 13.5 | 3,327.5 1,530 - 4,500 | 15.4 13.1 - 17.8 | 82.8 73.1 - 91.2 | 71.3 58.7 - 90.6 |
| OROYA | | | | | | |
| (12,296 p.s.n.m.) 16 sujetos | 24.5 17 - 40 | 13.6 9.9 - 16.4 | 3,142.5 2,600 - 3,420 | 15.6 12.2 - 18.6 | 80.3 74.1 - 87.7 | |
| MOROCOCHA | | | | | | |
| (14,982 p.s.n.m.) 12 sujetos | 26.5 20 - 34 | 12.5 7.9 - 17.3 | 3,196.1 2,265 - 4,500 | 16.2 12.4 - 19.6 | 77.4 65.3 - 86.4 | 60.1 42.7 - 83.0 |
| TICLIO | | | | | | |
| (15,926 p.s.n.m.) 6 sujetos | 25.7 18 - 39 | 14.6 9.2 - 18.1 | 2,780 2,150 - 3,000 | 16.8 15.8 - 18.1 | 81.5 73.0 - 87.7 | 70.7 62.7 - 78.0 |

El número de sujetos del binomio "madre-recién nacido" estudiado en Ticlio es muy pequeño, debido a la dificultad de encontrar madres en el momento del parto, las cuales prefieren bajar a La Oroya donde encuentran más facilidades para su atención.

2.— "1 minuto-residuo": los valores así obtenidos siempre fueron inferiores a los logrados con el método de "proporción de desnaturalización alcalina" en todas las alturas estudiadas.

En el Cuadro IV se presentan los resultados referentes al estudio del binomio "madre-recién nacido", en Lima, La Oroya, Morococha y Ticlio.

La edad de las madres en el momento del parto fue semejante; muchas de ellas mostraron una marcada anemia, que fue más acentuada en las nativas de la altura. El peso de los recién nacidos en la mayoría estaba dentro de los valores considerados como normales a nivel del mar; algunos tenían un peso que se acepta como indicativo de prematurez. En la altura es difícil fijar la prematurez o la postmadurez del recién nacido en lo que respecta al tiempo de la gestación, debido a la incapacidad informativa de las madres. Impresiona que a mayor altura el peso promedio del recién nacido tiende a ser menor.

La concentración de la hemoglobina circulante del recién nacido en la altura cae dentro de los valores considerados como normales a nivel del mar.

Walker y Turnbull (1953) (27) señalaron que la cifra de hemoglobina en la sangre del cordón umbilical del feto a término puede variar de 14.8 a 21.0 gr./100 ml., dependiendo del grado de hipoxia a la cual el feto esté sometido en los días precedentes al nacimiento. Entre nosotros, Picón (1944) (28) encontró en la sangre del cordón umbilical del recién nacido en Lima el valor hemoglobínico de 15.2 ± 0.43 (12.2-17.2) grs./100 ml.

Loret de Mola (1955) (29) halló en 8 recién nacidos en Oroya en la sangre de la vena umbilical del cordón 16.5 (14.4-18.2) grs. de Hb por 100 ml., y en la sangre capilar del talón 20.0 (16.0-23.5) grs./100 ml.; y en 4 recién nacidos en Morococha encontró en la sangre del cordón 18.3 (14.8-21.0) grs. de Hb/100 ml., en la sangre capilar del talón 23.0 (20.7-26.0) grs. por 100 ml. Los pesos de estos recién nacidos fluctuaban entre 2,415 y 3,565 gramos.

C. Reynafarje (1959) (30) en 23 recién nacidos en Lima observó un valor promedio de Hb de 15.4 grs./100 ml. (desviación standard 1.30); en 23 recién

nacidos en Oroya, 16.0 grs./100 ml. (d.s. 1.54), y en 9 recién nacidos en Morococha 16.8 grs./100 ml. (d.s. 2.57).

En el presente estudio los valores de Hb F en la sangre del cordón umbilical de Oroya, Morococha y Ticlio fueron de 80.3, 77.4 y 81.5 % respectivamente, similares a los valores normales para el recién nacido en Lima, 82.8 %.

Walker y Turnbull (1955) (5) en una revisión de las publicaciones sobre el tema, desde 1930 a 1953, presentan como valores normales 50-98 % de Hb F circulante en el recién nacido.

Beaven y col. (1960) (4) en 34 muestras de sangre del cordón de recién nacidos, encontraron una cifra media de 76 % (65-90 %) de Hb F (24).

Abrahamov y asoc. (1956) (31), Cook y col. (1957) (32) y Jonxis (1959) (33) refieren que en la sangre de recién nacidos normales el porcentaje de Hb F cae dentro de niveles arriba señalados; que en recién nacidos prematuros la concentración de la Hb F al nacimiento es alta, mientras que es baja en los recién nacidos postmadurez.

Walker y Turnbull (5), en particular, interpretan estas variaciones en términos de hipoxia fetal como un estímulo para la producción preferencialmente continuada de Hb F. Muchos consideran que el porcentaje de Hb F en el recién nacido puede ser un criterio seguro para establecer su edad gestacional. En el presente estudio el porcentaje más alto de Hb F encontrado fue de 91.2% y correspondió a una niña nacida en Lima prematura, de alrededor de 7 meses, y con un peso de 1,500 grs.

DISCUSION

Los eritrocitos de las personas normales contienen 3 tipos de hemoglobinas, diferentes en la estructura de la porción globina de la molécula: A_0 ($\alpha_2\beta_2$), F ($\alpha_2\gamma_2$) y A_2 ($\alpha_2\delta_2$). En el hombre durante el desarrollo fetal es posible distinguir hemoglobinas tipos: embrionario (Gowers_I, Gowers_{II}, y Portland_I), fetal (F) y adulta (A). Al nacer la proporción de síntesis de las cadenas polipeptídicas hemoglobínicas es máxima para la "alfa", baja para "beta", y muy baja para "delta", y activa para "gamma". Gracias a los trabajos de Schroeder y col. (1963) (34) conocemos la secuencia de los amino ácidos de la cadena polipeptídica "gamma" de la Hb F. La homología entre las cadenas péptidas "beta" y "gamma" es más marcada que la homología entre "beta" y "alfa" (35). "Permanece un misterio porque la Hb F

HEMOGLOBINA FETAL, %

Adultos normales. Método de Singer y col. [2]

| | Nivel del mar | Cerro de Pasco | Mina Aguilar | Ticlio |
|-----------------------------------|---------------|----------------|--------------|-------------|
| Singer y col. (1951) (2), USA | 0.5-1.7 | | | |
| Aste-Salazar y col. (1959) (38) | 1.21 ± 0.16 | | | 1.41 ± 0.07 |
| Aste-Salazar (1966) (39), Perú | 1.21 ± 0.16 | | | 1.41 ± 0.07 |
| Rathe (1959) (40), Argentina | | | 2.0 (*) | |
| Lust y col. (1963) (41), Francia | 1.3(0.1-2.4) | | | |
| Foura (1966) (42); Perú | 0.74 ± 0.06 | | | |
| | 0.326-2.40) | | | |
| Figallo y asoc. (1969) (43), Perú | 0.57 ± 0.03 | 0.87 ± 0.05 | | |
| Quesada y col. (1970) (44) Perú | 1.39 ± 0.79 | | | |

Recién nacidos normales, a término (Sangre del cordón umbilical). Método de Singer y col. [2]

| | Nivel del mar | Ciudad de México | Morococha | Ticlio |
|--|---------------|-------------------|-------------|-------------|
| Aste-Salazar y Krumdieck, (1957/sig.) (**), Perú | 71.3 | | 60.1 | 70.7 |
| | (58.7-90.6) | | (42.7-83.0) | (62.7-78.0) |
| Minnich y asoc. (1962) (45), USA | 78.1 | | | |
| | (60.0-96.7) | | | |
| Lust y col. (1963) (41), Francia | 66.7 | | | |
| Armstrong y col. (1963) (46), USA | 74.0 | | | |
| | (63.0-87.0) | | | |
| Aguado y col. (1965) (47), México | | 80.0 ± 14.26 | | |
| | | (23.8-99.9) (***) | | |
| Faura (1966) (42), Perú | 55.91 ± 3.278 | | | |
| Quesada y col. (1970) (44), Perú | 65.44 ± 8.79 | | | |
| Dumler (1971) (48), Perú | 75.88 ± 4.41 | | | |

Recién nacidos normales, a término (Sangre del cordón umbilical). Método de Betke [22]

| | Nivel del mar | Oroya | Morococha | Ticlio |
|--|---------------|-------------|-------------|-------------|
| Aste-Salazar y Krumdieck, (1957/sig.) (**), Perú | 82.8 | 80.3 | 77.4 | 71.5 |
| | (73.1-91.2) | (74.1-87.7) | (65.3-86.4) | (62.7-78.0) |

Hemoglobina fetal recién nacidos, %. Método de Singer y col. [2]

| | Pre-Término | A Término | Post-Término |
|------------------------------------|-------------|-------------|--------------|
| Abrahamov y asoc. (1956) (31), USA | | 85.5 | 65.1 |
| | | (64.1-95.0) | (54.4-76.4) |
| Minnich y asoc. (1962) (45), USA | 81.7 | 77.8 | |
| Smith (1966) (49), USA | | 90.0 | 60.0 |
| Dumler (1971) (48), Perú | 82.6 | 75.9 | |

(*) Mina Aguilar (Tucumán, Argentina) a 4,515 mts. s.n.m.

(**) Presente trabajo.

(***) Ciudad de México a 2,240 mts. s.n.m.

es una proteína diferente, con cadenas "gamma" en lugar de cadenas "beta", al menos que existan ligadas a alguna significación evolucionaria para estas diferencias" (Ingram) (36).

¿Por qué las cadenas hemoglobínicas "beta" sustituyen a las cadenas "gamma"? En otras palabras, ¿por qué el mecanismo de "conmutación" fisiológico que existe en las células rojas, determina que la Hb F será producida en el feto y la Hb A lo será en el adulto? Muchos investigadores han planteado diferentes hipótesis para explicar este proceso.

Pequeñas cantidades de Hb F pueden ocurrir en la sangre de los sujetos adultos normales; cantidades aumentadas de Hb F pueden producirse en una variedad de circunstancias ambientales y bajo control genético. La concentración de la Hb F normal aumenta en la sangre bajo varias condiciones fisiológicas y patológicas. Así, en la vida intrauterina la Hb F representa casi el 100% de la hemoglobina circulante en el feto; en el recién nacido 55-90%; en el adulto normal 1-2%; en la "persistencia de Hb F benigna hereditaria" 30-100%; en las hemoglobinopatías 2-25%; en la thalassemia tipo "beta" 2-100% y en otras enfermedades hematológicas (anemia nutricional, ictericia esferocítica, anemia aplásica constitucional, hemoglobinuria nocturna paroxística, anemia hemolítica adquirida, leucemia granulocítica crónica, leucemia mieloblástica aguda, pronunciada hematopoyesis extramedular, etc.) se encuentra aumentada en variables proporciones. En la mujer embarazada se encuentra un ligero aumento de la Hb F, explicada en parte por el hecho que variables cantidades de células fetales pueden atravesar la placenta pasando a la circulación maternal. Factores fisiológicos pueden también jugar un rol en la cantidad de Hb F presente en la sangre maternal. Se ha postulado que la gonadotropina coriónica u otro producto del tejido trofoblástico puede estimular la producción de la Hb F (26), (37).

Se ha encontrado una amplia variación en el contenido de la Hb F en la sangre del cordón umbilical del recién nacido a término. Muchos autores hallan una correlación inversa significativa entre el contenido de Hb F y la duración de la gestación: prematuros mayor concentración, post-maturos menor; mientras que, ninguna correlación hay con el peso, sexo, raza del recién nacido. Se ha discutido mucho sobre la correlación entre la concentración de la Hb F al nacer y la madurez fetal. Jonxis (33) considera que "cuando uno trata de obtener del porcentaje de Hb F en los recién nacidos (a término, prematuros o post-maturos) una penetración en la proporción de síntesis de la Hb F, hay que tener en cuenta que la longevidad de un eritrocito fetal es más corta que la del eritrocito de un individuo de más edad".

Hollingsworth (53) encontró a nivel del mar que los eritrocitos fetales, obtenidos del cordón umbilical al nacer, "marcados" con cromato radioactivo, tenían un tiempo de vida corto en los recipientes adultos normales transfundidos. En la opinión de este autor esta característica no tiene relación con la cantidad de Hb F (empleó el método de Singer). C. Reynafarje (54) observó que los hematíes de los recién nacidos en la altura (Oroya, 12,296 p.s.n.m.) tienen la misma longevidad que la observada en los recién nacidos a nivel del mar.

Singer y col. (2) con su método "1 minuto-residuo" obtuvieron en individuos adultos normales para hemoglobina fetal valores de 0.5 a 1.7% de la concentración total de hemoglobina. Con este método un valor por encima de 2.0% puede considerarse fuera de la zona normal. De los 113 sujetos adultos normales que hemos estudiado (38) y (39) en Ticlio, 21 (18.6%) presentaron "1 minuto-residuo" mayor del 2.0% repartidos así: 2.01-3.00% en 18 sujetos, 3.01-4.00% en dos, y 4.01-5.00% en uno. White y Beaven (7) consideran que es dudoso que la fracción hemoglobínica "álcali-resistente", encontrada en la sangre de los sujetos adultos normales con el método de Singer, sea solamente Hb F. Betke y col. (50) señalan que es bien sabido que la mayor parte de este "residuo" no es Hb F verdadera, sino algún otro compuesto "heme" cuya naturaleza se desconoce.

Nuestras observaciones en sujetos adultos normales: 32 en Lima (150 metros s.n.m.) y 38 en Ticlio (4,826 metros s.n.m.), que representan las alturas más extremas estudiadas, muestran la estrecha semejanza entre los correspondientes valores de las medias de velocidad e inclinación de la "proporción de desnaturalización alcalina". Con respecto a ésta, los hallazgos nos permiten establecer que no hay diferencias entre los sujetos adultos normales del nivel del mar y los de las grandes alturas, ni con los pocos pacientes con "soroche crónico" que hemos estudiado en Morococha y en Ticlio (42).

En nuestras observaciones a nivel del mar y en las diferentes alturas estudiadas encontramos que los porcentajes de Hb F en la sangre del cordón umbilical del recién nacido están dentro de los valores considerados como normales a nivel del mar, pero con tendencia hacia los valores altos. No nos ha sido posible seguir una observación prolongada de los recién nacidos en la altura para determinar el momento de desaparición de la Hb F (39).

Se señala a la hipoxia como factor estimulante de la producción de Hb F en el feto. Es bien conocido que la saturación de oxígeno de la sangre arterial de los individuos viviendo en las grandes alturas es menor que la de los su-

jetos a nivel del mar. En 1948, Hurtado y Aste-Salazar (52) encontraron los siguientes valores de las medias de Hb O₂% arterial en adultos normales nativos o residentes en: Oroya (12,296 p.s.n.m.) 87.6%, Morococha (14,982 p.s.n.m.) 81.4% y Ticlio (15,926 p.s.n.m.) 80.7%; mientras que en Lima (490 p.s.n.m.) era 96-98%.

C. Reynafarje, en 1951, observó que la actividad eritropoyética medular no es significativamente diferente en el recién nacido en la altura cuando se compara con la del recién nacido a nivel del mar (30).

"La función de la Hb F es aún desconocida; no parece ser necesaria para transferir oxígeno de la sangre maternal a la fetal, y en efecto muchos mamíferos aparentemente no producen hemoglobina tipo fetal" (Ingram) (36). La explicación de la función de la Hb F generalmente aceptada es que representa "una adaptación específica a la vida in útero, proveyendo al feto con eritrocitos con una mayor afinidad por el oxígeno" (Darling).

Está demostrado que la "curva de disociación de oxígeno" de la "sangre total" fetal humana cae a la izquierda de la curva de las mujeres normales, embarazadas o no, significando "mayor afinidad" y "capacidad de carga", y "más completa descarga de oxígeno". Esto haría más fácil para la circulación fetal obtener oxígeno de la hemoglobina adulta maternal por intercambio en la placenta. Cuando se dialisan frente a la misma solución tampón "soluciones" de Hb F y de Hb A, ambas muestran la misma curva de afinidad por el oxígeno. Por ello, parece que intrínsecamente las dos hemoglobinas tienen similares características de equilibrio con el oxígeno, pero que el ambiente de la sangre fetal y de la adulta difieren suficientemente para hacer que sus hemoglobinas se comporten diferentemente" (55), (36).

La aclimatación a las grandes alturas se alcanza con el desarrollo de una serie de mecanismos fisiológicos compensatorios para reducir la hipoxia tisular. Uno de estos mecanismos es la forma y posición de la "curva de disociación de oxígeno" de la hemoglobina adulta.

Barcroft, en 1922, en Cerro de Pasco (56), encontró que la "curva de disociación de oxígeno de la oxihemoglobina de los nativos adultos estaba desviada a la izquierda". Keys y asoc. (1936) (57) en las alturas de Chile observaron que "a constante pH celular en todas las estaciones por encima de los 9,200 pies, había una tendencia uniforme hacia una afinidad disminuida de la hemoglobina por el oxígeno en los miembros de la expedición". Hall (1936) (58) indica que "la hemoglobina de los residentes en las grandes alturas pa-

rece tener una menor afinidad por el oxígeno que la de los recién llegados", y añade "hay la posibilidad que esta diferencia sea una peculiaridad racial o individual".

La desviación a la izquierda de la curva de disociación de oxígeno de la Hb A es "perjudicial" para la descarga de oxígeno, y por ello "perjudicial para el organismo". En 1944, Aste-Salazar y Hurtado (59), trabajando en Morococha (4,540 metros s.n.m.) con los mismos métodos empleados por Keys y asoc. (57), encontraron una ligera disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en sujetos normales recién llegados a la altura o en residentes, especialmente en los nativos tanto al pH arterial como al pH standard 7.4. Estas observaciones fueron confirmadas por B. Reynafarje, en 1953, en Morococha (61).

Aste-Salazar y Hurtado (59) fueron los primeros en establecer que esta "desviación a la derecha de la curva de disociación de la oxihemoglobina en las grandes alturas puede interpretarse como un ajustamiento compensatorio favorable en un ambiente de baja tensión de oxígeno". Los hallazgos de estos autores en recién llegados a la altura confirman los previamente obtenidos por Dill y asoc. (1931) en Leadville (USA) (60) a una altura de 3280 metros y por Keys y asoc. (57) en los Andes de Chile.

El planteamiento de Aste-Salazar y Hurtado (59) que "la desviación a la derecha de la curva de disociación de oxígeno de la oxihemoglobina es un mecanismo compensatorio para reducir la hipoxia tisular en las grandes alturas", no fue aceptado por muchos investigadores; principalmente, los colaboradores de Barcroft lo criticaron duramente. Pero el tiempo y una variedad de condiciones "in vivo", se han encargado de darles la razón a los investigadores peruanos y reconocer la prioridad de su interpretación.

A partir de 1950, varios investigadores han observado que la sangre de pacientes con eritrocitosis secundaria compensatoria a la hipoxia sistémica difiere de la sangre normal por tener una afinidad disminuida por el oxígeno. Esta disminuida afinidad determina desplazamiento a la derecha de la curva de disociación de la oxihemoglobina y una mejora en la liberación de oxígeno de la sangre a los tejidos, a una dada tensión de oxígeno capilar en la hipoxia sistémica asociada con cardiopatía congénita cianótica (62), insuficiencia cardíaca (63), anemia (64), enfermedad pulmonar crónica (65), y vida en las grandes alturas (66), (69). Por éstos y otros estudios parece probable que una multiplicidad de factores actúan en concierto para gobernar la afi-

nidad de la hemoglobina por el oxígeno. Es ahora aparente que la posición de la curva de disociación de oxígeno de la oxihemoglobina no sólo es influenciada por los cambios en pH, PCO_2 y temperatura, sino también por la interacción de la desoxihemoglobina con los compuestos fosfato orgánicos, principalmente el 2,3 difosfoglicerato (DPG) dentro del eritrocito (66), (67), (68), (69), (70).

Fuera de la vida intrauterina en algunas ocasiones parece que la producción de la Hb F es un mecanismo compensatorio que favorece su síntesis cuando la de la Hb A es deficiente o ausente (1), (2). Todo lo contrario ocurre en las grandes alturas, dada la gran actividad eritropoyética medular estimulada por la hipoxia. El stress patológico medular, severo o crónico, se asocia con continuación o reactivación de los mecanismos productores de Hb F. En cambio, el stress fisiológico medular: policitemias primarias o secundarias (4) (8), embarazo (4) (26), hipoxia asociada a cardiopatías congénitas cianóticas (4) (7), no parece estar consistentemente asociado con reaparición de Hb F. Nuestros resultados nos permiten plantear que la hipoxia de las grandes alturas, una condición ambiental modificada, no estimula la producción de la Hb F en el adulto nativo ni en el recién llegado normales, a pesar de la gran hipoxemia arterial, 78-80% HbO_2 , y diferentes grados de policitemia.

En la altura en el adulto se produce exclusiva o casi exclusivamente hemoglobina adulta normal, porque fisiológicamente es más útil frente a la condición hipóxica existente. Bajo esta condición el problema básico se relaciona al suministro de oxígeno a los tejidos, para esta función es de apreciable beneficio una desviación de la curva de disociación de oxígeno a la derecha, aun si ligera, ya que se requiere menor caída del pO_2 arterial para rendir a los tejidos igual cantidad de oxígeno que a nivel del mar, especialmente si consideramos la aumentada cantidad de hemoglobina sanguínea presente (59).

SUMMARY

A study has been carried out on the possibility that chronic hypoxia, to which the subjects who are born and live at great altitudes are submitted, could produce high values of fetal hemoglobin.

Normal new borns and normal adult subjects from Lima (150 meters over sea level), Oroya (3,726 mts.), Morococha (4,540 mt.) and Ticlio (4,826 mts.), were studied. To measure the amount of fetal hemoglobin two methods were employed: "proportion of alkaline —denaturation" and the "1 minute-residue".

At great altitudes the amount of Hb F fall between the normal range at sea level. It was established that there is no difference in the "proportion of alkali-denaturation" of the Hb, between the subjects (newborns and adults) living at sea level and those living at great altitudes, or of the few patients with chronic "soroche".

It is postulated that the hypoxia of great altitudes does not stimulate the production of Hb F either in the native or in the newborn, or in Monge's disease patients, regardless of the oxygen insaturation of arterial blood, and normal adult Hb is produced almost exclusively. The basic problem exists in the supply of oxygen to the tissues. A deviation to the right of the oxygen dissociation curve of oxi-Hb would be of great benefit in that process, as there is need of less fall of the arterial pO_2 to supply the tissues with the same amount of oxygen than at sea level, specially if the increased quantity of Hb present is considered.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— ITANO, H. A.: "Human Hemoglobins". *Science* 117: 89, 1953.
- 2.— SINGER, K., CHERNOFF, A. I. and SINGER, L.: "Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation". *Blood*: 6: 413, 1951.
- 3.— CHERNOFF, A. I.: "Immunologic studies of hemoglobins. II. Quantitative precipitin test using antifetal hemoglobin sera". *Blood*: 8: 413, 1953.
- 4.— BEAVEN, G. H., ELLIS, M. J. and WHITE, J. C.: "Studies on human fetal haemoglobin. II. Foetal haemoglobin levels in healthy children and adults and in certain haematological disorders". *Brit. J. Haematol.* 6: 201, 1960.
- 5.— WALKER, J. and TURNBULL, E. P. N.: "Haemoglobin and red cells in the human foetus. III. Foetal and adult haemoglobin". *Arch. of Dis. in Child.* 30: 111, 1955.
- 6.— DRABKIN, D. L.: "Introduction: Heredity and environment in structure of hemoglobin". *Federation Proc.* 16: 740, 1957.
- 7.— WHITE, J. C. and BEAVEN, G. H.: "Foetal Haemoglobin". *Brit. Med. Bull.* 15: 33, 1959.
- 8.— WHITE, J. C. and BEAVEN, G. H.: "A review of the variation of human haemoglobin in health and disease". *J. Clin. Pathol.* 7: 175, 1954.
- 9.— CHERNOFF, A. I.: "The human hemoglobins in health and disease". *The New Eng. J. of Med.* 253: 322, 365, 416, 1955.
- 10.— EDINGTON, G. M. and LEHMANN, H.: "Expression of the sickle-cell in Africa". *Brit. Med. J.* 2: 1328, 1955.
- 11.— WENT, L. N. and McIVER, J. E.: "An unusual type of hemoglobinopathy resembling sickle cell-Thalassemia disease in a Jamaican family". *Blood* 13: 559, 1958.

- 12.— JACOB, G. F. and RAPER, A. B.: "Hereditary persistence of foetal haemoglobin production and its interaction with the sickle cell trait". *Brit. J. Haematol.* 4: 138, 1958.
- 13.— HERMAN, E. C. Jr. and CONLEY, C. L.: "Hereditary persistence of fetal hemoglobin. A family study". *Amer. J. Med.* 29: 9, 1960.
- 14.— THOMPSON, R. B., MITCHENER, J. W. and HUISMAN, T. H. J.: "Studies on the fetal hemoglobin in the persistent high Hb F anomaly". *Blood* 18: 267, 1961.
- 15.— OLIVIA, J. and MYERSON, R. M.: "Hereditary persistence of fetal hemoglobin". *Amer. J. Med. Sc.* 241: 215, 1961.
- 16.— WHEELER, J. T. and KREVANS, J. R.: "The homozygous state of persistent fetal hemoglobin and the interaction of persistent fetal hemoglobin with thalassaemia". *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 109: 217, 1961.
- 17.— SCHROEDER, W. A., STURGEON, P. and BERGREN, W. R.: "Chemical investigation of haemoglobin F from an individual with persistent foetal haemoglobin". *Nature (London)* 193: 1161, 1962.
- 18.— CONLEY, C. L., WEATHERALL, D. J., RICHARDSON, S. N., SHEPARD, M. K. and CHARACHE, S.: "Hereditary persistence of fetal hemoglobin: A study of 79 affected persons in 15 Negro families in Baltimore". *Blood* 21: 261, 1963.
- 19.— McCORMICK, W. F. and WALKER, R. H.: "Immunologically different "normal" fetal hemoglobins". *Am. J. Clin. Path.* 33: 500, 1960.
- 20.— THOMPSON, R. B., WARRINGTON, R. L. and BELL, W. N.: "Physiologic differences in Hb variants". *Am. J. Physiol.* 208: 198, 1965.
- 21.— DRABKIN, D. L.: "Spectrophotometric studies. XIV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobins in men in comparison with those in other species". *J. Biol. Chem.* 164: 703, 1946.
- 22.— BETKE, K.: "Die Hämoglobintypen des Menschen". *Biochem. Zeitschrift* 322: 186, 1951.
- 23.— HURTADO, A., MERINO, C. and DELGADO, E.: "Influence of anoxemia in the hemopoietic activity". *Arch. Int. Med.* 75: 284, 1945.
- 24.— BEAVEN, G. H., ELLIS, M. J. and WHITE, J. C.: "Studies on human foetal haemoglobin. I. Detection and estimation". *Brit. J. Haematol.* 6: 1, 1960.
- 25.— HUISMAN, T. H. J.: "The identification of human hemoglobins". pág. 18. *Abnormal hemoglobins. A Symposium organized by the Council for International Organization of Medical Sciences. 1959.* Edited by J. H. P. Jonxis and J. F. Defafresnaye. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- 26.— RUCKNAGEL, D. L. and CHERNOFF, A. L.: "Immunologic studies of hemoglobin". III. Fetal hemoglobin changes in the circulation of pregnant women. *Blood* 10: 1092, 1955.
- 27.— WALKER, J. and TURNBULL, E. P. N.: "Haemoglobin and red cells in the human foetus and their relation to the oxygen content of the blood in the vessels of the umbilical cord". *Lancet* 2: 312, 1953.
- 28.— PICON R., E.: "El cuadro hemático del recién nacido y de la madre en trabajo de parto". Tesis, 1949. Facultad de Medicina. U.N.M.S.M., Lima, Perú.
- 29.— LORET DE MOLA, L.: "Observaciones hematológicas en el recién nacido en las grandes alturas". Tesis, 1955. Facultad de Medicina, U.N.M.S.M., Lima, Perú.

- 30.— REYNAFARJE, CESAR: "Bone marrow studies in the newborn infants at high altitudes". *J. of Pediatrics* 54: 152, 1959.
- 31.— ABRAHAMOV, A., SLZBERGER, M. and BROMBERG, Y. M.: "Fetal hemoglobin in postmature newborn infants". *Am. J. Clin. Pathol.* 26: 146, 1956.
- 32.— COOK, C. D., BRODIE, H. R. and ALLEN, D. W.: "Measurements of fetal hemoglobin in newborn infants". Correlation with gestational age and intrauterine hypoxia". *Pediatrics* 20: 272, 1957.
- 33.— JONXIS, J. H. P.: "Foetal haemoglobin in children". pág. 114. *Abnormal Hemoglobins: A Symposium organized by the Council for International Organizations of Medical Sciences. 1959.* Edited by J. H. P. Jonxis and J. F. Delafresnaye Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- 34.— SCHROEDER, W. A., SHELTON, J. R., SHELTON, J. B., CORMICK, J. and JONES, R. T.: "The amino acid sequence of the gamma chain of human fetal hemoglobin". *Biochemistry* 2: 992, 1963.
- 35.— INGRAM, V. M.: "The hemoglobins in genetics and evolution". 1963. Columbia University Press. New York and London.
- 36.— INGRAM, V. M.: "Hemoglobin and its abnormalities". 1961. Ch. C. Thomas, Publisher. Springfield, Illinois.
- 37.— RUCKNAGEL, D. L. and NEEL, J. V.: "The hemoglobinopathies", pág. 158. *Progress in Medical Genetics. Vol. 1., 1961.* Edited by A. G. Steinberg. Grune & Stratton. New York and London.
- 38.— ASTE-SALAZAR, H., NUE, H., KRUMDIECK B., C. y ZAVALETA, A. "Diferenciación de Hbs humanas en las grandes alturas". XXI Congreso Internacional de Ciencias Fisiológicas. Resumen de las Comunicaciones, pág. 23. Agosto 9-15, 1959. Buenos Aires. Arg.
- 39.— ASTE-SALAZAR, H.: "Diferenciación de Hbs humanas en las grandes alturas". *Acta Científica Venezolana* 17: 117, 1966.
- 40.— RATHE, G.: "Estudio de la Hb de los residentes a 4,515 metros s.n.m." XXI Cong. Intern. Cien. Fisiol. Resum. Comunic. pág. 226. Ag. 9-15, 1959. Bs. As., Arg.
- 41.— LUST, M., MASURER, R., T. SIEN, K. S. et KINT, M.: "Recherches sur les taux d'hemoglobine Foetale". *Arch. Francaises de Pediatrie* 20: 621, 1963.
- 42.— FAURA I., C. A.: "Hb fetal en humanos y en auquénidos". Tesis de Bachiller. 1966. Fac. Farmacia y Bioquímica. U.N.M.S.M., Lima.
- 43.— FIGALLO, M. A., BUSTAMANTE, E. L., GUEVARA, E. H. y ASTE-SALAZAR, H.: "Human Hb studies at high altitude". *Clin. Research* 17: 31, 1969.
- 44.— QUESADA, N. y GRESHIKEN, C.: "Determinación de Hb álcali-resistente en adultos normales, recién nacidos y niños". *Arch. Peruanos de Patología Clínica* 24: 171, 1970.
- 45.— MINNICH, V., CORDONNIER, J. K., WILLIAMS, W. J. and MOORE, C. V.: "Alpha, beta and gamma hemoglobin polypeptide chains during the neonatal period with description of a fetal form of Hb D alfa St. Louis". *Blood* 18: 137, 1962.
- 46.— ARMSTRONG, D. H., SCHROEDER, W. A. and FENNINGER, W. D.: "A comparison of the percentage of fetal Hb in human umbilical cord blood as determined by chromatography and by alkali denaturation". *Blood* 22: 554, 1963.
- 47.— AGUADO FLORES, C., JURADO GARCIA, E. y ALVAREZ DE LOS COBOS, J.: "La Hb fetal en el período neonatal". *Bol. Méd. del Hosp. Infantil de México*, 22: 569, 1965.

- 48.— DUMLER, F.: "Hb fetal en el recién nacido". Tesis Bach. en Medicina. Univ. Per. Cayetano Heredia, 1971.
- 49.— SMITH, C. H.: "Blood diseases of infancy and childhood". pág. 4/sig., 1966. The C. V. Mosby C., St. Louis.
- 50.— BETKE, K., MARTI, H. R. and SCHLICHT, I.: "Estimation of small percentages of foetal haemoglobin". *Nature* 184: 1877, 1959.
- 51.— JONXIS, J. H. P. and VISSER, H. K. A.: "Determination of low percentages of fetal hemoglobin in blood of normal children". (A.M.A.) *J. of Dis. of Children* 92: 588, 1956.
- 52.— HURTADO, A. and ASTE-SALAZAR, H.: "Arterial blood gases and acid-base balance at sea level and at high altitudes". *J. Applied Physiol.* 1: 304, 1948.
- 53.— HOLLINGSWORTH, J. W.: "Lifespan of fetal erythrocytes". *J. Lab. and Clin. Med.* 45: 469, 1955.
- 54.— REYNAFARJE, CESAR: "Red cell lifespan in newborn at sea level and high altitudes". *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 100: 256, 1959.
- 55.— ALLEN, D. W. and JANDL, J. H.: "Factors influencing relative rates of synthesis of adult and fetal hemoglobin in vitro". *J. Clin. Invest.* 39: 1107, 1960.
- 56.— BARCROFT, J.: "Architecture of physiological function". Cambridge Univ. Press. 1934.
- 57.— KEYS, A., HALL, F. G. and GUZMAN-BARRON, E. S.: "The position of the oxygen dissociation curve of human blood at high altitude". *The Amer. J. of Physiol.* 115: 292, 1936.
- 58.— HALL, F. G.: "The effect of altitude on the affinity of hemoglobin for oxygen". *The J. of Biol. Chem.* 115: 485, 1936.
- 59.— ASTE-SALAZAR, HUMBERTO and HURTADO, ALBERTO: "The affinity of hemoglobin at sea level and at high altitudes". *The Amer. J. of Physiol.* 142: 733, 1944.
- 60.— DILL, D. B., EDWARDS, H. T., FOLLING, A., OBERG, S. A., PAPPENHEIMER, Jr., A. M. and TALBOTT, J. T.: "Adaptations of the organism to changes in oxygen pressure". *J. Physiol.* 71: 47, 1931.
- 61.— REYNAFARJE, BALTAZAR: "Curva de disociación de oxígeno de la hemoglobina en nativos de las grandes alturas". Tesis de Bachiller en Medicina, 1953. U.N.M.S.M., Lima.
- 62.— MORSE, M., CASSELS, D. E. and HOLDER, M.: "The position of the oxygen dissociation curve of the blood in cyanotic congenital heart disease". *J. Clin. Inv.* 29: 1098, 1950.
- 63.— METCALFE, J., DHINDSA, D. S. and EDWARDS, M. J.: "Decreased affinity of blood for oxygen in patients with low-output heart failure". *Circ. Res.* 25: 47, 1969.
- 64.— TORRANCE, J., JACOBS, P., RESTREPO, A., ESCHBACH, J., LENFANT, C. and FINCH, C. A.: "Intraerythrocytic adaptation to anemia". *New Eng. J. Med.* 283: 165, 1970.
- 65.— LENFANT, C., WAYS, P., AUCUTT, C. and CRUZ J., J.: "Effect of chronic hypoxic hypoxia on the O₂-Hb dissociation curve and respiratory gas transport in man". *Respirat. Physiol.* 7: 7, 1969.
- 66.— LENFANT, C., TORRANCE, J., ENGLISH, E., FINCH, C. A., REYNAFARJE, C., RAMOS, J. and FAURA, J.: "Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and on organic phosphate levels". *J. Clin. Invest.* 47: 2652, 1968.
- 67.— BENESCH, R. and BENESCH, R. E.: "The effect of organic phosphates from human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26: 162, 1967.

- 68.— CHANUTIN, A. and CURNISH, R. R.: "Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes". *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 96, 1967.
- 69.— EATON, J. W., BREWER, G. J. and GROVER, R. F.: "Role of red cell 2, 3-diphosphoglycerate in the adaptation of man to altitude". *J. Lab. & Clin. Med.* 73: 603, 1969.
- 70.— OSKI, F. A., GOTTLIEB, A. J., DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.: "Red cell 2, 3-diphosphoglycerate levels in subjects with chronic hypoxemia". *New Eng. J. Med.* 280: 1165, 1969.