

## ¿LA HEMOGLOBINA, ES UN MARCADOR GENETICO INVARIABLE? HALLAZGOS EN LA GALLINA CRIOLLA ANDINA.<sup>1</sup>

Fabiola León-Velarde., Olga Mejía., Daniel Espinoza.,  
Jim Larrick., Carlos Monge.

Departamento de Ciencias Fisiológicas e Instituto de Investigaciones de la Altura.  
Universidad Peruana Cayetano Heredia. Apartado 4314. Lima, Perú.

**RESUMEN.** La gallina doméstica (*Gallus gallus*) fue introducida en Sud-América con la conquista española. Esta (Gal-NM), presenta una baja afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> (Hb-O<sub>2</sub>) e hipereritremia. Sin embargo, hemos encontrado en Taraco (Puno, 4,000 m), y reproducido a nivel del mar, un grupo de gallinas con una alta afinidad de la Hb-O<sub>2</sub> y ausencia de hipereritremia (Gal-ALT). La afinidad de la Hb-O<sub>2</sub> (P<sub>50</sub>) fue determinada por el método de las mezclas en sangre total y en Hb libre de fosfatos (Hb-lavada) antes y después de la adición de inositol hexafosfato (IHP). La adición del IHP se comportó de manera diferente en las dos hemoglobinas lavadas. La diferencia (Hb-lavada-Hb + IHP) fue 42.2 torr para Gal-NM y 26.3 torr para Gal-ALT, lo que es una indicación de que Hb de la Gal-ALT es fosfato-dependiente. Una mutación, Thr-->Ser, encontrada en la posición 69 de la cadena β podría haber inducido la fosfato-dependencia. Nuestro hallazgo muestra un cambio genético en la función de la Hb, adquirido en un periodo evolutivo extremadamente corto, de aproximadamente 500 años; muestra también, que individuos de una misma especie, que viven a NM y en la altura, pueden diferenciarse genéticamente mediante un cambio en la función de la Hb como reflejo de un cambio en su estructura.

**Palabras claves:** altura, afinidad de la hemoglobina, gallina, inositol hexafosfato, mutación.

### INTRODUCCION

La necesidad de oxígeno en el ambiente hipóxico de las grandes alturas puede satisfacerse de diversas maneras. Entre éstas podemos mencionar: la variación de la afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> (Hb-O<sub>2</sub>) y/o la modificación de las propiedades de oxigenación de la sangre, el aumento de la capilaridad y la redistribución del flujo sanguíneo, el cambio del dintel de respuesta

**ABSTRACT.** Chicken (*Gallus gallus*) were introduced in South America during the Spanish conquest and therefore their adaptation time to high altitude is approximately 500 years. A group of chicken from the Peruvian Andes (4,000m) carrying a high hemoglobin-oxygen affinity has been identified and reproduced at sea level. The hemoglobin-oxygen affinity (P<sub>50</sub>) has been determined, by a mixing technique, in whole blood and in phosphate-free hemoglobin solutions before and after the addition of inositol hexaphosphate (IHP). The Andean chicken alpha and beta globin genes were sequenced. A mutation Thr->Ser in position 69 of the β-chains of Hb A has been found. The addition of IHP to the phosphate-free hemoglobin solutions increased the affinity significantly less in the sea-level chicken (42.2 torr) suggesting that the high-affinity hemoglobin is probably dependent on a molecular change affecting the allosteric regulation. These findings show the unprecedented observation in nature of a hemoglobin genetic change in an exceptionally short evolutionary time in a sea-level terrestrial bird. This observation also shows that the same species can be differentiated from its sea-level counterpart by a genetic change in the Hb function as a reflect of its structure.

**Key words:** high altitude, hemoglobin-oxygen affinity, hen, inositol hexaphosphate, mutation.

a la hipoxia y la producción de un mayor número de glóbulos rojos, entre otros; de estos, la oxigenación de la sangre, a cargo de la Hb, tiene un papel sustancial. Esta es una función intrínseca de las propiedades de la Hb en su unión con el O<sub>2</sub>, así como de la interacción de ésta con efectores heterotrópicos como fosfatos polianiónicos, O<sub>2</sub>, protones e iones cloro los cuales disminuyen la afinidad de la Hb por el O<sub>2</sub>. El inositol 1,2,3,4,5,6 penta o hexa-fosfato (IPP o

Received December 15, 1994; revised and accepted March 27, 1995.

Presented at the First World Congress on High Altitude Medicine and Physiology. La Paz, Bolivia, September 11 to 16, 1994.

Fabiola León-Velarde, Profesora Principal, Departamento de Ciencias Fisiológicas/Instituto de Investigaciones de la Altura, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Olga Mejía, Investigador Auxiliar, Laboratorio de Transporte de Oxígeno, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Daniel Espinoza, Investigador Auxiliar, Laboratorio de Transporte de Oxígeno, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Jim Larrick, Investigador Principal, Instituto Palo Alto de Medicina Molecular, California.

Carlos Monge C., Profesor Investigador, Departamento de Ciencias Fisiológicas/Instituto de Investigaciones de la Altura, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Correspondencia: Fabiola León-Velarde. Laboratorio de Transporte de Oxígeno. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Apartado 4314, Lima 100, Perú.

IHP), se une tanto a la Hb aviar como humana, reduciendo su afinidad, y es el más efectivo modulador de la Hb en el glóbulo rojo, con una predominancia de concentración en los glóbulos rojos de las aves.

Los mamíferos y aves andinos, entre otras características, presentan como propiedad adaptativa de gran importancia, una alta afinidad de la Hb-O<sub>2</sub> y no responden a la hipoxia con hipereritremia (Monge-M. y Monge-C, 1968; Monge y Whitttembury, 1976; Black y Tenney, 1980). Los animales de nivel del mar poseen por el contrario, una baja afinidad de la Hb-O<sub>2</sub> y hacen importantes hipereritremias cuando son expuestos a bajas presiones parciales ambientales de O<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub>). Con respecto a las aves se ha postulado (Braunitzer y Hiebl, 1988; Espinoza, 1988) que es en base a estas características que las aves nativas de la altura: gallaretas (*Fulica americana peruviana*) y gaviotas andinas (*Larus serranus*), yanavicos (ibis, *Plegadis ridgway*), huallatas (ganso andino, *Chloepaga melanoptera*), ganso de los Himalayas (*Anser indicus*), etc. son capaces de anidar y reproducirse con gran eficiencia en su ambiente hipóxico, sin presentar evidencias de mal de altura. La gallina doméstica, oriunda del Viejo Mundo (Murra, 1981; Dunin-Borkowski, 1986), tiene, por el contrario, no sólo una limitada capacidad para reproducirse en la altura como resultado de su baja incubabilidad, sino que además es susceptible de adquirir el mal de altura en la etapa adulta (Burton y Smith, 1969; Ploog, 1973). Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de hipereritremia con baja afinidad de la Hb-O<sub>2</sub>; el corazón derecho se hipertrofia, se eleva grandemente la presión de la arteria pulmonar y en casos severos sobreviene la muerte por insuficiencia cardíaca. Aún cuando la gallina doméstica comercial es la más extendida a todo lo largo del país, en las grandes alturas del Perú (por encima de 3,500 m.), se pueden ver gallinas "criollas" que presentan un adecuado éxito reproductivo, alta resistencia a las enfermedades comunes, y en particular al mal de altura (testimonios y testificación directa).

Con el fin de determinar las características de la Hb de estas gallinas criollas de altura, se llevó a cabo un estudio bajo la siguiente hipótesis: la intensa mortalidad de gallinas en el ambiente hipóxico de las grandes alturas, y la fuerte presión ambiental que constituye la disminución

de la PO<sub>2</sub> habrían actuado favorablemente de manera de provocar el desarrollo de una línea de gallinas adaptadas a la altura. Esta adaptación estaría expresada como una mayor afinidad de la Hb por el oxígeno (León-Velarde y col., 1991), ocasionada ya sea, por la aparición de cierta cantidad de una variante de Hb, o por la variación en la concentración de los moduladores de la afinidad. De tratarse de una variante de la molécula de Hb original, ésta se expresaría como una Hb con una cadena adicional o como una Hb con una modificación en la secuencia de aminoácidos (León-Velarde y col., sometido para publicación) que altere, ya sea la unión de la Hb con el O<sub>2</sub>, o la unión de la Hb con sus efectores alostéricos (Mejía y col., 1994).

## MATERIAL Y METODOS

### a) Afinidad de la Hb por el oxígeno.

Se trabajó con gallinas criollas de Taraco, Puno (Gal-ALT; 4,000 m); en ellas se determinó la afinidad de la Hb por el oxígeno con el método de las mezclas por medio de la medición de la PO<sub>2</sub> en la sangre a 50% de saturación de la Hb con oxígeno (P<sub>50</sub>). El proceso analítico se basa en la determinación del PO<sub>2</sub> de una mezcla, a 41° C, de 2 alícuotas iguales de la misma sangre, una totalmente oxigenada y la otra totalmente reducida (Edwards y Martin, 1966; Sheid y Meyer, 1978). El factor Bohr utilizado para corrección del pH fue de -0.38 para la sangre de NM y de -0.51 para la sangre de la Gal-ALT. Para la determinación de la concentración de Hb, se utilizó el método colorimétrico por reacción con la azidometahemoglobina. Las lecturas se realizaron con un fotocolorímetro Hemocue.

### b) Secuenciamiento de la Hb.

Las muestras de sangre de todos los animales nativos de la altura (n=9) y de 5 de sus descendientes a nivel del mar se enviaron al Instituto Palo Alto de Medicina Molecular (California) para la determinación de la secuencia de aminoácidos de la Hb mediante la técnica de la "Polimerase Chain Reaction", PCR, (cDNA a mRNA).

### c) Obtención de la Hb "lavada".

Las muestras de sangre de todos los animales fueron "lavadas" de los fosfatos, y se midió



posteriormente, la magnitud del efecto del fosfato comercial más usado para estos fines, el inositol hexafosfato (IHP). Todas las determinaciones fueron comparadas con muestras de sangre provenientes de gallinas criollas de nivel del mar (Gal-NM). Para "lavar" la Hb, las muestras de sangre total fueron centrifugadas en una centrífuga refrigerada por 5 min a 3,000 rpm y el plasma removido por aspiración. Los glóbulos rojos se lavaron por 3 veces en una solución de NaCl 0.154M. Luego de la lisis de los eritrocitos con agua destilada, el hemolizado se centrifugó a 9,500 rpm por 30 min para remover el estroma. Esta Hb quedó libre de fosfatos orgánicos e inorgánicos al pasarla por una columna de celulosa de intercambio aniónico (DEAE Cellulose, Sigma Chemical Co. San Luis, Mo) que previamente fue equilibrada con Tris-HCl 0.05M, pH 7.4 y eluida con el mismo buffer. La solución de Hb obtenida se concentró por aproximadamente 15 horas hasta obtener una concentración de Hb = 5-6 g/dl. Esta Hb fue la designada como "lavada" (Isaacs y col., 1976). Se determinó el  $P_{50}$  a pH 7.5,  $PCO_2$ , 40 torr y 41° C en muestras de sangre total, en soluciones de Hb "lavada" y en presencia de 2 mM de IHP. Las muestras de sangre se mantuvieron en hielo, y se trabajó rápidamente teniendo en cuenta la alta tasa metabólica de los glóbulos rojos nucleados, cambio de pH y contenido de fosfatos orgánicos.

## RESULTADOS

### a) Afinidad de la Hb por el oxígeno.

La Tabla 1 contiene los parámetros sanguíneos obtenidos a partir de la determinación *in vitro* del  $P_{50}$ . Puede verse que tanto los valores corregidos ( $P_{50}$ ) como no corregidos de  $P_{50}$  ( $P_{50}$  std) son significativamente diferentes entre las Gal-ALT y Gal-NM ( $p < 0.001$ ). La alta afinidad de la Hb- $O_2$  de las gallinas de altura ha sido transmitida a los descendientes incubados y nacidos a nivel del mar (Lima) lo que asegura el carácter genotípico de este hallazgo. La presión parcial de  $CO_2$  ( $PCO_2$ ) de las muestras de sangre equilibradas no mostró diferencias, sin embargo el pH fue menor en la sangre de Gal-ALT ( $p < 0.012$ ), lo que probablemente indica una menor capacidad amortiguadora de la sangre de las Gal-ALT. Dado que todas las aves fueron estudiadas a nivel del mar, la concentración de

Hb resultó la misma en los dos grupos (León-Velarde y col., 1991).

### b) Secuenciamiento de la Hb.

El análisis estructural de la cadena  $\beta$  de la Hb de la Gal-ALT mostró una sustitución thr---> Ser en la posición 69. No se encontró ningún cambio en el secuenciamiento de la cadena  $\alpha$ . El secuenciamiento completo de la Hb de la Gal-ALT, se encuentra en el Banco Mundial de Genes (N° de Acceso: M73995) (León-Velarde y col., enviado a publicación).

Tabla 1. Parámetros de la curva de disociación de la Hb en animales de nivel del mar (Gal-NM; n=8) y de la altura (Gal-ALT; n=9)

	Hb	pH (g/dl)	$PCO_2$ (torr)	n	$P_{50}$ (torr)	Boltz	$P_{50}^{std}$ (torr)
Gal-NM	9.80	7.48	39.40	3.45	51.90	-0.36	50.90
ES	0.40	0.04	2.56	0.23	2.89	0.03	2.82
Gal-ALT	9.00	7.33	38.30	3.48	35.60	-0.51	28.90
ES	0.82	0.04	3.69	0.17	2.01	0.05	0.87
P	0.58	0.01	0.80	0.92	0.00	0.09	0.00

B = pendiente de la relación  $\log PO_2 = f(\text{delta pH})$ .

n = valor de Hill, pendiente de la relación  $\log (\text{Sat. } O_2 / 100 - \text{Sat. } O_2) = f(\log PO_2)$ .

### c) Efecto del IHP en la Hb "lavada".

La Tabla 2 contiene los datos que permiten comparar el  $P_{50}$  std entre la sangre total, la Hb "lavada", y la Hb "lavada" + IHP en ambos grupos. El  $P_{50}$  std de la sangre total en las Gal-NM fue de 51.1 torr, significativamente mayor que el de las Gal-ALT que fue de 31.4 torr. Estos valores confirman los resultados de la Tabla 1. Los valores de la HB "lavada" fueron 6.3 y 6.0 torr, para las Gal-NM y Gal-ALT respectivamente. Luego de la adición de la misma concentración de IHP a la sangre con Hb "lavada", los  $P_{50}$  std fueron de 48.5 torr para Gal-NM y 32.3 torr para Gal-ALT. La adición de IHP se comporta de manera diferente en las dos Hb "lavadas". La diferencia (Hb lavada-Hb+IHP) es de 42.2 torr para Gal-NM y de 26.3 torr para Gal-ALT ( $p < 0.001$ ). Esto es, expuestas las dos hemoglobinas a idénticas concentraciones de IHP, la afinidad de la Hb de la Gal-ALT es casi la mitad de la afinidad de la Hb de la Gal-NM. esta diferencia es una indicación de que la Hb de la Gal-ALT es fosfato-dependiente (Mejía y col., 1994).



Tabla 2.- Afinidad de la Hb-O<sub>2</sub> (P<sub>50</sub>), pH y hemoglobina en sangre total, Hb-lavada y Hb-lavada+inositol hexafosfato en gallinas de nivel del mar y en gallinas de altura

Sangre total			Hb-Lavada			Hb-Lavada + IHP (2 mM)			
Hb	pH	P <sub>50</sub> St	Hb	pH	P <sub>50</sub> st	Hb	pH	P <sub>50</sub> St	
Nivel del mar (Gal-NM)									
1	10.7	7.2	43.2	4.9	6.8	6.1	5.8	7.0	48.5
2	9.9	7.2	50.6	5.1	6.8	5.0	5.1	6.8	42.0
3	10.5	7.2	47.6	4.6	6.5	6.7	4.6	6.8	41.5
4	9.9	7.1	50.9	6.8	6.6	7.5	6.8	6.9	54.4
5	12.1	7.2	59.2	4.0	6.8	8.6	4.0	6.8	53.8
6	8.3	7.2	55.1	4.0	6.0	4.0	4.2	6.7	50.6
X	10.2	7.2	51.1	4.9	6.6	6.3	5.1	6.8	48.5
ES	0.5	0.0	2.3	0.4	0.1	0.7	0.4	0.04	2.3
Altura (Gal-ALT)									
1	10.9	7.4	31.3	4.0	6.8	6.2	6.6	6.9	25.3
2	14.2	7.4	36.7	5.3	6.9	6.5	5.3	7.1	35.6
3	12.5	7.2	25.8	5.6	6.9	6.1	6.3	7.0	30.6
4	20.3	7.4	33.6	6.4	6.8	4.7	8.9	7.1	35.9
5	16.9	7.4	29.6	6.8	7.0	6.4	5.4	6.9	34.3
X	15.0	7.4	31.4	5.6	6.9	6.0	6.5	7.0	32.3
ES	1.6	0.05	1.85	0.5	0.1	0.35	0.7	0.05	2.0
p	0.008	0.001	0.00	NS	NS	NS	NS	0.00	0.0

## DISCUSION

Se ha reportado una alta afinidad de la Hb por el oxígeno en una gran variedad de aves y mamíferos genéticamente adaptados a la vida en la altura (Hall, 1936; Lutz, 1980; Holle y col., 1977; Black y Tenney, 1980; Espinoza, 1988). Entre estos, en los últimos años, las aves han recibido particular atención. Hiebl y col (1986) proponen un mecanismo tipo cascada para el transporte de O<sub>2</sub> en la Hb del ganso de los Himalayas; el mecanismo implicaría un cambio Pro--->Ala en la posición 119 de la Hb A. Asimismo, una sola mutación en la cadena β, posición 55 de la Hb del ganso andino ha sido considerada beneficiosa para la vida en la altura (Hiebl y col., 1987). En el caso del Gyps rueppellii, un ave a la que se le ha visto volando hasta los 11,300 m, se ha descrito también un mecanismo tipo cascada para el transporte de O<sub>2</sub> de la Hb, pero con la presencia de hasta 4 tipos diferentes de Hb (en vez de dos) con tres niveles de afinidad: baja (A y A'), alta (D/D), y afinidad intermedia (Hiebl y col., 1988). Resumiendo todos estos hallazgos, Braunitzer y Hiebl (1988) han postulado que la adaptación a la altura es el resultado de una mutación específica que distingue a estos animales de sus más cercanos parientes de nivel del mar. Estos cambios parecerían tener como rol fisiológico el respon-

der al ambiente hipóxico manteniendo un adecuado suministro de oxígeno al organismo. La gallina de altura no parecería ser la excepción. En este caso, es probable que el reemplazo de los aminoácidos en la cadena β, haya inducido a un cambio en la conformación del sitio de unión del IHP, del sitio mismo de la unión con el IHP, o en general, del ambiente local en el que se da la unión de la Hb con el mismo, generando como resultado una menor afinidad de la Hb de la Gal-ALT por el IHP.

En los mamíferos andinos, particularmente los Lamini, la alta afinidad se ha logrado por control genético al reducir el efecto alostérico del 2,3 difosfoglicerato con las cadenas β. Este efecto disminuido ha sido interpretado como debido a una mutación en β2 (His--->Asn) que interrumpiría el contacto en α-2 (Asp), dando como resultado un aumento en la afinidad de la Hb-O<sub>2</sub>. La Asn en β-2 se encuentra presente también en la alpaca y la vicuña, lo que estaría indicando que esta mutación apareció en el ancestro común del guanaco y la vicuña (posiblemente el género Hemiauchenia) que dió origen a las formas domésticas llama y alpaca. Este control genético como mecanismo de adaptación a la altura, difiere de los Camélidos, los cuales también tienen una alta afinidad de la Hb por el O<sub>2</sub>, pero fosfato-independiente (Braunitzer, 1980; Kleinschmidt y col., 1986). Ambos mecanismos son fundamentalmente diferentes, por lo que sugieren que la alta afinidad de la Hb de los actuales Camelus y Lamini, se adquirió de manera independiente, que no sería un carácter heredado de un ancestro común, sino más bien una convergencia evolutiva en lo que a la función se refiere.

Nuestro hallazgo, de un cambio genético en la función de la Hb (que habría dado como resultado una mayor afinidad de la Hb por el O<sub>2</sub> fosfato-dependiente) que puede ser adquirido en un corto período evolutivo, sustenta la posibilidad de la presentación de cambios en la función de la Hb (afinidad de la Hb-O<sub>2</sub>) sin tener que recurrir a explicaciones filogenéticas sobre la adquisición de este carácter. La alta mortalidad de gallinas con Hb de baja afinidad y elevada concentración de hemoglobina, y la fuerte presión ambiental que constituye la baja PO<sub>2</sub> de las grandes alturas, contribuiría a la selección del genotipo de alta afinidad que hemos identificado.



La adquisición de esta Hb de alta afinidad se habría llevado a cabo en un período evolutivo que corresponde aproximadamente a los 500 años del descubrimiento de América, periodo prácticamente despreciable en términos evolutivos. Desde un punto de vista académico, el hallazgo del carácter flexible de la alta afinidad de la Hb-O<sub>2</sub> (cambio de baja afinidad a alta afinidad de la Hb-O<sub>2</sub> en una misma especie) en un periodo evolutivo extremadamente corto, constituye la primera descripción de este tipo en la clase vertebrados. Desde un punto de vista práctico, este hallazgo establece la posibilidad de regenerar una línea de gallinas de "altura" genéticamente adaptadas, allí donde la reproducción y producción masiva de aves de corral es una tarea casi imposible. Los pobladores de las altiplanicies andinas ya no se verían obligados a obtener gallinas de la costa o de la selva elevando los costos de dicho producto. El presente estudio supone la posibilidad de reproducir gallinas aún en las grandes alturas y de generar un mejor acceso de esta fuente de proteína animal al habitante de los Andes peruanos.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú (CONCYTEC) al cual expresamos nuestro más profundo agradecimiento.

### REFERENCIAS

- Black C.P., Tenney SM. 1980. Oxygen transport during progressive hypoxia in high-altitude and sea-level waterfowl. *Respir. Physiol.* 39:217-239.
- Braunitzer G. 1980. Phosphat-Haemoglobin Wechselwirkung: zur atmung des adulten menschen, des menschlichen foetus, des lamas und des kamels. *Vehr. Dtsch. Zool. Ges. Gustav. Fisher Verlag, Stuttgart*, pp. 202-213.
- Burton R., Smith A. 1969. Induction of cardiac hypertrophy and polycythemia in the developing chick at high altitude. *Fed. Proc.* 28 (3):1170-1177.
- Dunin-Borkowski C. 1986. Gallina Araucana Prehispánica, Mito o realidad? Tesis de Maestría en Ciencias con mención en Biología. UPCH. Lima-Perú.
- Edwards M.J., Martin R.J. 1966. Mixing technique for the oxygen-hemoglobin equilibrium and Bohr effect. *J. Appl. Physiol.* 21 (6): 1898-1902.
- Espinoza D. 1988. La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en la gallareta (*Fulica americana peruana*) y su implicancia fisiológica. Tesis (Bachiller). Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, pp.46.
- Hall F.G. 1936. The effect of altitude on the affinity of hemoglobin for oxygen. *J. Biol. Chem.* 115:485-490.
- Hiebl I., Scheeganss D., Braunitzer G. 1986. High altitude respiration of birds. The primary structures the  $\beta$ -chains of the bar-headed goose (*Anser indicus*), the greylag goose (*Anser anser*) and the Canada goose (*Branta canadensis*). *Biol. Chem. (Hoppe-Seyler)*;367:567-599.
- Hiebl I. Braunitzer G., Schneeganss D. 1987. High altitude respiration of geese. The primary structures of the major and minor hemoglobine components of adult Andean goose (*Chloephaga melanoptera*. Anatidae): the mutation Leuser in position 55 of the  $\beta$ -chains. *Biol. Chem. (Hoppe-Seyler)*; 368:1559-1569.
- Hiebl I., Weber RE., Schneeganss D., Braunitzer G. 1988. High altitude respiration of birds. Structural adaptations in the major and minor hemoglobin components of adult Ruppell's Griffon (*Gyps rueppellii*, Aegypiinae): a new molecular pattern for hypoxic tolerance. *Chem (Hoppe-Seyler)*;369:233-240.
- Holle J.P., Meyer M., Scheid P. 1977. Oxygen affinity of duck blood determined by in-vivo and in-vitro technique. *Respir. Physiol.*;29:355-361.
- Isaacs RE., Harkenss DR., Froeman GA., Sussman SA. 1976. Studies on avian erythrocyte metabolism. I. Procedure for separation and quantitation of the major phosphorylated metabolic intermediates by anion exchange chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.*;53:95-99.
- Kleinschmidt T., Marz J., Jurgens KD., Braunitzer G. 1986. Interaction of allosteric effectors with  $\alpha$ -globin chains and high altitude respiration of mammals. The primary structure of two tylopoda hemoglobins with high oxygen affinity: vicuña (*Lama vicugna*) and alpaca (*Lama pacos*). *Biol. Chem. (Hoppe-Seyler)*;367:153-160.
- León-Velarde F., Espinoza D., Monge CC., Maizon C. de 1991. A genetic response to high altitude hypoxia: high hemoglobin-oxygen affinity in chicken (*Gallus gallus*) from the Peruvian Andes. *C.R. Acad. Sci.*; 313(9) 401-406.
- León-Velarde F., Espinoza D., Larrick JW., Monge CC. Rapid genetic adaptation of chicken hemoglobin to life at high altitude. *C. R. Acad. Sci.*; (sometido a publicación).
- Lutz P.L. 1980. On the oxygen affinity of bird blood. *Am. Zool.*; 20:187-198.
- Mejía O., F. León-Velarde., C. Monge C. 1994. The effect of inositol hexaphosphate in the high-affinity hemoglobin of the Andean chicken (*Gallus gallusw*). *Comp. Biochem. Physiol.* 109 B (2/3): 437-441.
- Monge C. Sr., C. Monge C. Jr. 1968. Adaptation of Domestic Animals. Edited by E.S. Hafez. Lea & Febiger. Filadelfia, p. 194-201.
- Monge CC., Whitembury J. 1976. High altitude adaptations

in the whole animal. In: Environmental Physiology of animal. Edited by J. Bligh, J.L. Cloudsley-Thompson and A.G. Macdonald. Blackwell Scientific Publications, p. 287-308.

Mirra JV. 1981. Las etnocategorías de un quipu estatal, En: La Tecnología en el Mundo Andino. Subsistencia y Mensuración. Vol. I. Editado por H. Lechtman y A. M. Soldi. Universidad Autónoma de México, pp. 433--442.

Ploog H. 1973. Physiological changes in broiler chickens (*Gallus domesticus*) exposed to a simulated altitude of 4267m. (14,000 Ft). MSC. on Poultry Science Thesis. The Pennsylvania State University. Pennsylvania.

Scheid P. Meyer M. 1978. Mixing technique for study of oxygen-hemoglobin equilibrium, a critical evaluation. J. Appl. Physiol.; 45(5): 818-822.