

HEMOPROTEINAS NATURALES DE TRANSPORTE DE OXIGENO Y SUS ANALOGOS SINTETICOS

Carla Galli Rigo-Righi

INTRODUCCION

La mayoría de los organismos terrestres son aeróbicos y requieren de oxígeno para cumplir sus funciones vitales. En organismos unicelulares, el O_2 necesario puede simplemente difundir a través de la membrana celular. Debido a su pequeño tamaño, la velocidad de suministro de O_2 por difusión es suficiente, por lo que no necesitan de ningún sistema adicional de almacenamiento o transporte de O_2 . En organismos multicelulares de mayor tamaño, en cambio, la simple difusión no abastece de suficiente O_2 para mantener el metabolismo; además, la solubilidad del O_2 en el citoplasma es muy baja. Los organismos complejos, por tanto, tienen que estar equipados de: una provisión de **compuestos con alta afinidad por O_2** y que lo ligen en forma reversible y, un **sistema apropiado para el transporte** de las especies oxigenadas a través de todo el cuerpo (ejm: sistemas circulatorios que incluyen conductos sanguíneos) [1].

Existen varias proteínas naturales del tipo hemo y no-hemo que se encargan del almacenamiento y transporte de O_2 . **Hemoglobina y mioglobina** son las más ampliamente distribuidas, en todos los vertebrados (con muy raras excepciones) y en algunos invertebrados; indudablemente, porque derivan de

los mucho más antiguos y comunes citocromos. Existe otra proteína que contiene una porfirina de Fe^{II}, la **clorocruorina** que se encuentra en algunas familias de gusanos segmentados. La **hemeritrina** y la **hemocianina** son proteínas no-hemo de hierro y cobre, respectivamente; se encuentran, la primera principalmente en gusanos marinos y la segunda en ciertos crustáceos y moluscos, incluyendo cefalopodos, gastropodos y otros. Algunas propiedades de estas proteínas se describen en la Tabla 1 [2].

Tabla 1 Comparación de algunas propiedades de pigmentos naturales que ligan oxígeno

	Hemoglobina	Hemeritrina	Hemocianina
Metal	Fe	Fe	Cu
Metal: O₂	Fe: O ₂	2 Fe: O ₂	2 Cu: O ₂
Estado de oxidación del metal en la desoxi proteína	Fe(II)	Fe(II)	Cu(I)
Coordinación del metal	Porfirina	Cadenas laterales de proteína	Cadenas laterales de proteína
Número de subunidades	4	8	Variable
Peso molecular	65,000	108,000	400,000-9,000,000
Color			
Oxygenada	Rojo	Violeta-Rosado	Azul
Desoxigenada	Rojo-azul	Incoloro	Incoloro

ESTRUCTURAS DE LA MIOGLOBINA Y GLOBINA

La mioglobina (Mb) es una proteína monomérica (Fig. 1) de 160 restos aminoácido (P.M. 17800) y una molécula de hemo (complejo hierro II-protoporfirina IX). La hemoglobina adulta (P.M. 64500) es una proteína tetramérica (Fig. 2), conteniendo dos subunidades α y dos subunidades β (de 141 y 146 restos aminoácido, respectivamente), con un grupo hemo por subunidad.

Las secuencias de aminoácidos (estructura primaria) de la mioglobina y de las cadenas α y β de la hemoglobina presentan numerosas diferencias; sin embargo, tienen estructuras terciarias muy similares, que consisten de ocho regiones helicoidales (estructura secundaria) simbolizadas con las letras A, B, C, D, E, F, G y H. Las secciones restantes (simbolizadas con 2 letras) son codos, segmentos no helicoidales o grupos terminales.

La mioglobina y las cadenas α y β de la hemoglobina humanas son muy semejantes a la mioglobina del esperma de ballena. El grupo hemo, que

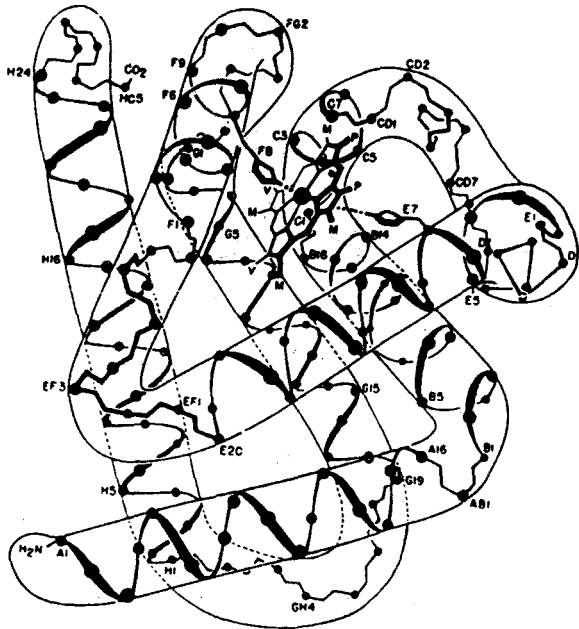


Fig. 1 Estructura de la mioglobina del esperma de ballena

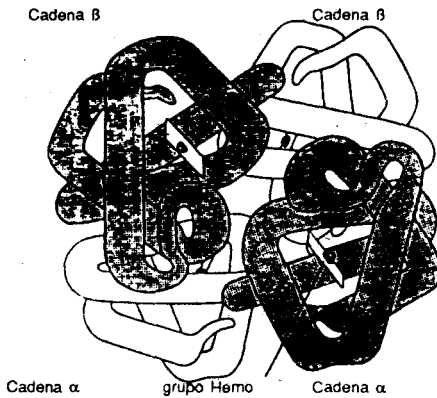


Fig. 2 Estructura cuaternaria de la hemoglobina

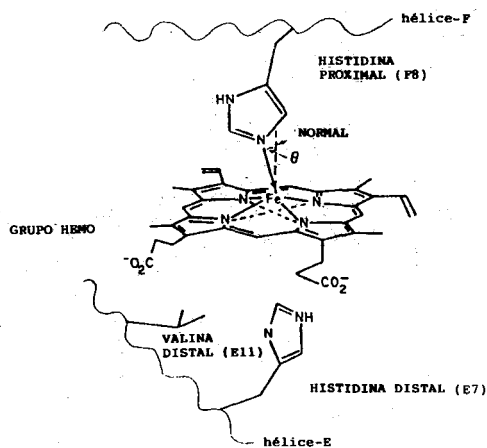


Fig. 3 Sitio de coordinación del O_2

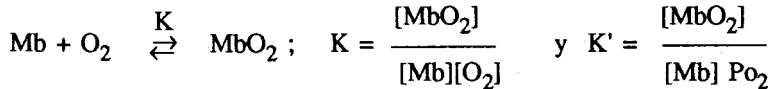
constituye el centro activo de la Mb y Hb, se encuentra encajado en una oquedad superior de la proteína globular entre los segmentos E y F, siendo su única conexión importante con la proteína, la establecida por el enlace coordinado entre el hierro y el átomo de nitrógeno imidazólico de la histidina en la posición F8. El grupo hemo, de naturaleza muy similar a un hidrocarburo aromático, es además mantenido en su posición por las fuerzas de Van der Waals que sobre él ejercen los restos hidrófobos de los aminoácidos que lo rodean. Entre los pocos grupos polares que se encuentran en la vecindad del hemo, están dos histidinas, la proximal (F8) unida directamente al hierro, y la distal (E7) que está al otro lado del plano de la porfirina y dirigida hacia el centro, que juega un papel en la unión del oxígeno [3]. Todo esto se puede apreciar claramente en la Figura 3.

AFINIDAD POR OXIGENO DE LAS HEMOPROTEINAS

Una forma de determinar la afinidad relativa por O_2 de la mioglobina y la hemoglobina consiste en medir la fracción de posiciones Fe^{II} oxigenadas como función de la presión parcial de oxígeno (P_{O_2}). En la Figura 4 se muestran las curvas típicas de porcentaje de saturación con O_2 versus P_{O_2} de la Hb y Mb humanas bajo condiciones fisiológicas. La diferencia entre ambas curvas es notable: la curva de la Mb es hiperbólica, mientras que la de Hb es

sigmoidal. A valores bajos de P_{O_2} , la mioglobina tiene mayor afinidad por el O_2 que la hemoglobina. Esta diferencia tiene una enorme importancia fisiológica: a las altas concentraciones de O_2 presentes en los pulmones, la proteína que transporta el O_2 , la Hb, debe estar casi saturada, pero debe tener menor afinidad por éste a las mucho menores P_{O_2} en los músculos, para cederlo con facilidad a la mioglobina que constituye la reserva de oxígeno muscular [4].

La forma **hiperbólica** de la curva de la **Mb** corresponde a un equilibrio simple expresado por:



donde si:

$$\theta = \text{fracción oxigenada} = \frac{[MbO_2]}{[Mb]_{\text{total}}}$$

entonces se cumple que:

$$\theta = \frac{K' P_{O_2}}{1 + K' P_{O_2}}$$

ecuación que puede ser transformada en:

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = K' P_{O_2}$$

En cambio, la curva **sigmoidal** de la **Hb** se ajusta a la ecuación empírica:

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = K' (P_{O_2})^n$$

en la que el exponente **n**, denominado **coeficiente de Hill**, tiene un valor de 2,8.

Hay que tener presente que la Hb es un tetrámero de subunidades de similar estructura, con un centro de unión O_2 -hemo en cada una; se dan cuatro equilibrios consecutivos con $K_{\text{total}} = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4$. La forma sigmoidal de

la curva de oxigenación y el hecho de que el coeficiente de Hill observado sea mayor que 1, indican que existe una **interacción cooperativa positiva** entre las subunidades. Esto significa que la unión de O_2 a una subunidad aumenta la afinidad por O_2 de las restantes. Inversamente, una vez que la Hb completamente oxigenada transfiere un O_2 a la Mb, las restantes moléculas de O_2 son retenidas más débilmente; por tanto, en los músculos, la transferencia del primer O_2 facilitará la de los restantes.

Si las subunidades fueran independientes, como sucede en la Mb o en las cadenas α y β aisladas de la Hb, se tendría un $n = 1$. Por otra parte, si la interacción cooperativa fuera tan fuerte que la unión de O_2 a una subunidad determinara la saturación inmediata de las tres restantes, resultaría que $n = 4$. Se concluye que el $n = 2,8$ corresponde a una interacción cooperativa moderada. Este fenómeno conocido como **interacción hemo-hemo** constituye un hecho notable dadas las separaciones de 25-40 Å entre los Fe^{II} de las distintas subunidades y su origen será discutido más adelante [2,3].

Existen tres condiciones importantes, aparte de la temperatura, que

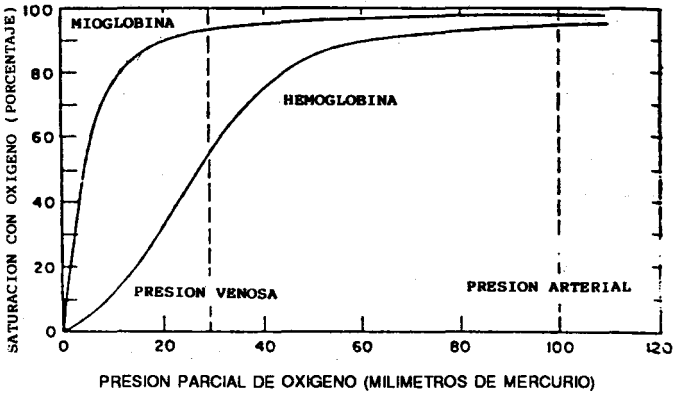


Fig. 4 Curvas de oxigenación de la Mb y Hb humana en condiciones fisiológicas

afectan las curvas de oxigenación de la hemoglobina, mas no las de la mioglobina: el pH, la concentración de CO_2 y la concentración de 2,3-difosfoglicerato.

La disminución de la afinidad de la Hb por el O_2 cuando desciende el pH de la sangre se denomina **efecto Bohr** y tiene un papel biológico importante

en la cesión de O_2 a los tejidos. La presencia de niveles altos de CO_2 y H^+ en los capilares de tejido metabólicamente activo (como músculos en contracción) promueve la liberación de O_2 de la HbO_2 . En los capilares alveolares de los pulmones se da el efecto recíproco, la alta $[O_2]$ allí presente promueve la descarga de CO_2 y H^+ . El **mecanismo** del efecto Bohr es el siguiente: la hemoglobina toma ca. $0,5H^+$ por cada molécula de O_2 que libera, lo que ayuda a regular el pH en tejidos activos. Esto indica que en la transición de oxi-a desoxihemoglobina aumenta la afinidad de algunas posiciones por H^+ , pudiendo éstas protonarse. Se crean así uniones salinas entre los nitrógenos protonados y los grupos negativos en la desoxi-Hb que la estabilizan, y la toman más rígida, decreciendo así su afinidad por O_2 (ver Efecto Alostérico en la Hemoglobina).

Un aumento en la concentración de CO_2 (a pH constante) también baja la afinidad por O_2 . Por último, el **2,3-difosfoglicerato** (DPG), un fosfato orgánico altamente aniónico presente en los glóbulos rojos humanos en una concentración muy similar a la de la hemoglobina, tiene un marcado efecto sobre su afinidad por O_2 . En ausencia de DPG, la $P_{1/2}(O_2)$ (presión parcial de O_2 necesaria para una saturación del 50%) de la Hb es 1 torr, como la de la Mb, mientras que si está presente, la $P_{1/2}(O_2)$ se torna 26 torr. En conclusión, el DPG baja la afinidad de la Hb por O_2 en un factor de 26, lo que es esencial para permitir a la Hb descargar O_2 a la Mb en los capilares de los tejidos [3,5].

CARACTERISTICAS DEL ENLACE FIERRO-OXIGENO

En las **formas desoxigenadas** de la mioglobina y la hemoglobina, el Fe^{II} , de alto espín, **sobresale** bastante del plano del anillo porfirínico hacia el nitrógeno imidazólico de la histidina F8 (Fig. 3). En cambio, en las **oxigenadas** el Fe^{II} , de bajo espín, se encuentra **casi en el plano**. Además, el ángulo θ (Fig. 3) entre el enlace Fe^{II} -N-imidazólico y la normal hemo (de 11° y 8° en desoxi-Mb y Hb, respectivamente) disminuye bastante. En cuanto al **ángulo Fe-O-O**, se ha determinado por estudios cristalográficos de rayos X un valor de 121° en MbO_2 y de 156° en HbO_2 . La variación es debida a ciertas interacciones, especialmente de enlace de hidrógeno, entre el O_2 y los restos aminoácido cercanos, como la His E7 [4].

Las **frecuencias de estiramiento** ν $Fe^{II}-O_2$ (determinadas por la técnica de resonancia Raman) son de 571 cm^{-1} (pH 8,5; $10^\circ C$) para $Hb-O_2$ y 572 cm^{-1} (pH 7,2; $10^\circ C$) para MbO_2 , mientras que aquellas ν $O=O$ (determinadas por IR) son 1103 cm^{-1} en MbO_2 y 1107 cm^{-1} en HbO_2 . Sin embargo, efectos de

acoplamiento de la ν O=O con vibraciones de los restos aminoácido proximales y distales en las hemoproteínas (o con el solvente y el ligando trans en compuestos modelo) hacen que los valores exactos (intrínsecos o no perturbados) de las ν O=O resulten controversiales [6].

Las porfirinas de Fe^{II} (d^6) suelen presentar tres estados de espín, cada uno con un número de coordinación y estructura característicos (Fig. 5). Las porfirinas de Fe^{II} con dos ligandos axiales (N.C.6.) son invariablemente diamagnéticas y de espín bajo con una configuración $t_{2g}^6 e_g^0$ ($S=0$), consistente con lo observado para la mioglobina y hemoglobina oxigenadas. Tienen el ion Fe^{II} en el plano. Las porfirinas de Fe^{II} de alto espín ($S=2$) son invariablemente pentacoordinadas (aunque lo inverso no necesariamente se cumple), con el átomo de hierro bastante por encima del plano de la porfirina hacia el único ligando axial. Esta es una característica casi general de la coordinación pirámide cuadrada y el hecho que se dé con ligandos axiales libres, indicaría que no es consecuencia de algún efecto estructural especial de la globina. Por último, las porfirinas de Fe^{II} con número de coordinación 4 y geometría pirámide cuadrada, como la tetrafenilporfirina, presentan un estado de espín intermedio ($S=1$); los enlaces Fe-N son tan cortos que causan cierta alteración de la planaridad. No tienen contraparte biológica [1].

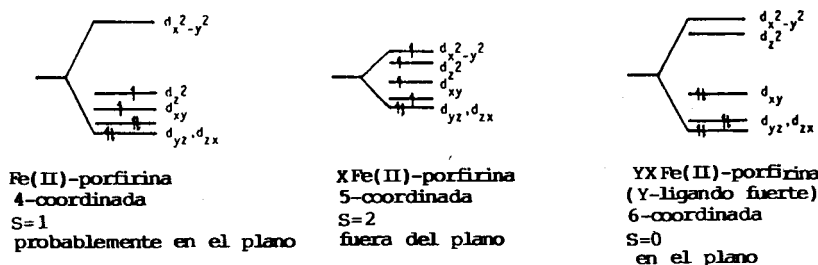


Fig. 5 Estados de Espín de Fe^{II} -porfirinas

Entre los modelos de enlace originalmente propuestos para la unión $\text{Fe}-\text{O}_2$ en estos compuestos están el triangular, "side-on", de Griffith y el angular, "end-on", de Pauling y Weiss (Fig.6). El enlace $\text{Fe}-\text{O}_2$ en el de Griffith (Fig. 6a) es similar al de una olefina con un metal de transición, con la molécula de oxígeno en un estado excitado singulete ($^1\Delta$) (Fig.7) y el Fe^{II} de espín bajo. Si bien se han obtenido complejos de este tipo con otros metales (de confi-

guración d^8 y d^{10} , todos son tetra- o hexacoordinados y ninguno involucra un ligando macrocíclico; un ejemplo típico es el $[\text{O}_2\text{IrCl}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2]$. El número de coordinación 7 requerido por el O_2 "side-on" en MbO_2 sería estéricamente desfavorable.

El modelo de Pauling (Fig. 6b) supone también O_2 singlete y Fe^{II} de espín bajo, pero en este caso el enlace sería análogo al de un complejo metalvinilo con enlace σ . El O_2 singlete con la configuración $(\pi^*)^2 (\pi^*)^0$ coordina al Fe^{II} ; el par de electrones en uno de los orbitales π^* es donado al orbital d_{z^2} del metal vía una interacción σ . Por otra parte, el orbital π^* vacante del O_2 ligado acepta electrones π del orbital d_{xz} del hierro. Se piensa que las propiedades de aceptor π del O_2 son más fuertes que su poder donador σ (Fig. 6c).

Este modelo (como el de Griffith) explica el diamagnetismo observado en términos de conversión del Fe^{II} de alto a bajo espín y de la excitación del O_2 del estado fundamental triplete al singlete al formarse el enlace.

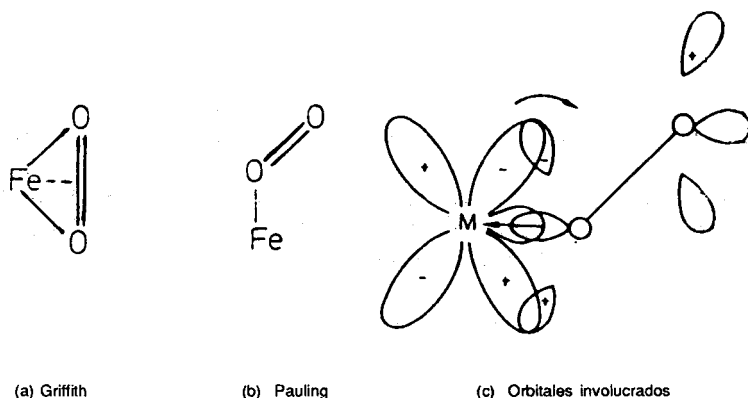


Fig. 6 Modelos de enlace fierro-oxígeno y orbitales que intervienen según Pauling

El modelo de Weiss es similar al de Pauling; la diferencia está en que plantea una transferencia completa de densidad electrónica del Fe^{II} al O_2 que lleva a la formulación $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}_2^-$. Explica el diamagnetismo del complejo en términos de una interacción antiferromagnética entre los espines del O_2^- ($S=1/2$) y el Fe^{III} ($S=1/2$) [2, 3, 6, 7].

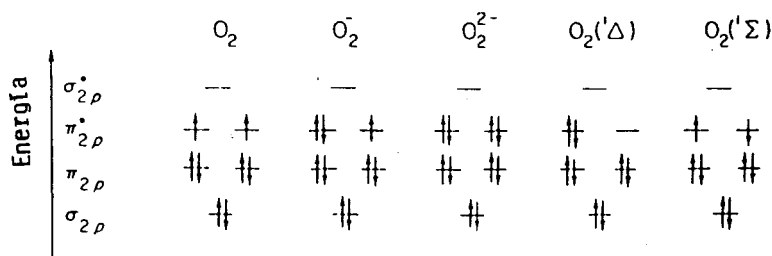


Fig. 7 Diagramas OM del O_2 , O_2^- , O_2^{2-} y estados excitados del O_2

Estudios estructurales por cristalografía de rayos X del clásico **complejo modelo** Fe(II)-(Tetrapivaloilamidofenilporfirina) (N-Metilimidazol) (O_2) han demostrado que el O_2 está unido "end-on" con un ángulo Fe-O-O de 136° , consistente con lo encontrado para la MbO_2 y la HbO_2 ; el complejo es también diamagnético. La distancia Fe-O de $1,75 \text{ \AA}$ es ca. $0,1 \text{ \AA}$ más corta que la esperada a partir de la suma de los radios covalentes y también más corta que la observada ($1,86 \text{ \AA}$) en complejos angulares $Co^{II}O_2$. La distancia O-O es $1,25 \text{ \AA}$, intermedia entre la del O_2 libre y la del ion superoxo O_2^- (Tabla 2). El complejo muestra además una banda ancha y débil a 1385 cm^{-1} en el IR por debajo de la $\nu O=O$ del oxígeno libre (el hecho que se convierta en una fuerte y aguda de área integrada similar a -175° indica que hay un equilibrio térmico entre diversos estados rotómeros). Todo esto indica que la **formulación correcta** es la de Pauling, $Fe^{II}O_2$, con Fe^{II} de bajo espín y O_2 singulete, que incluye una moderada retrodonación $d\pi-p\pi$ $Fe^{II}O_2$ [2,7].

Tabla 2 Propiedades del enlace O-O en O_2 , O_2^- y O_2^{2-}

	O_2	O_2^-	O_2^{2-}
Orden de Enlace	2	1,5	1
Longitud de Enlace (Å)	1,21	1,28	1,49
$\nu O-O (\text{cm}^{-1})$	1560	1150-1100	850-740

La **base axial** juega un **papel importante** en el enlace hierro-oxígeno. Numerosos estudios en compuestos modelo han demostrado que la *afinidad por O_2 aumenta con la basicidad del ligando trans*. Bases como N-metilimidazol

o piperidina donan electrones a los orbitales $d\pi$ del hierro, favoreciendo la retrodonación $\text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{O}_2$, que es la principal contribuyente a la fuerza del enlace. Esto se refleja en un incremento notable de la ν ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$), aproximadamente 66 cm^{-1} , por introducción de piperidina al complejo pentacoordinado $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ (tetrafenilporfirina). Como es de esperar, se observa una tendencia inversa en la ν ($\text{O}=\text{O}$) que disminuye, en este caso particular, en 38 cm^{-1} . Se ha observado también que interacciones estéricas o de enlace de hidrógeno con el ligando O_2 tienen el efecto de disminuir la ν ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$) con ángulo Fe-O-O creciente [6,8].

Existe, aunque en mucho menor grado, un efecto electrónico de las cadenas laterales en el anillo porfirínico sobre la afinidad por oxígeno. Se ha encontrado, tanto en compuestos modelo como en la mioglobina, que la constante de equilibrio para la unión de O_2 (K_{O_2}) aumenta en el orden acetilo < vinilo < etilo, lo que es consistente con el hecho que un sustituyente donador de electrones favorece la donación del anillo porfirínico al hierro y por consiguiente al O_2 [9].

EFFECTO ALOSTERICO EN LA HEMOGLOBINA

La hemoglobina es considerada comúnmente como el prototipo de una proteína alostérica (del griego *allos* "otro", y *stereos* "forma").

Las formas oxigenada y desoxigenada, denotadas como **R (relajada)** y **T (tensa)** respectivamente, difieren tanto en la conformación de las cadenas individuales (estructura terciaria) como en la orientación relativa de las cadenas (estructura cuaternaria).

La forma *R* tiene mucho mayor afinidad por O_2 que la *T*. Así, mientras que la hemoglobina humana en su estado alostérico *R* posee una $P_{1/2}(\text{O}_2)$ de 0,29 torr, en el *T* requiere una $P_{1/2}(\text{O}_2)$ de 40 torr (son valores promedio de las cadenas α y β) [4].

El notable cambio de estructura se refleja en el hecho que los cristales de Hb colapsan al oxigenarse. La oxigenación trae consigo, entre otros, grandes cambios en ciertas uniones electrostáticas y de enlace de hidrógeno entre las cadenas α y β . Así, la oxi-Hb (forma *R*) tiene más libertad de movimiento que la desoxi-Hb (forma *T*), pues en esta última hay ocho uniones salinas entre grupos de carga opuesta de las diferentes cadenas que la hacen más rígida [5].

Justamente en estas diferencias estructurales de la oxi-Hb y desoxi-Hb tiene su origen la **interacción hemo-hemo**, que es un efecto alostérico por el que un cambio de forma en la hemoproteína determina un cambio en su afinidad por O₂.

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar esta importante interacción cooperativa, pero todos ellos tienen en común la idea que los cuatro grupos hemo son partes integrales de un mismo sistema conformacional. Una de las teorías (Gelin y Karplus, 1977) explica así este fenómeno. Al unirse una molécula de O₂ a un grupo hemo de una cadena α , el Fe^{II} convertido en espín bajo se acerca considerablemente al plano de la porfirina jalando consigo al N-imidazólico. Esto hace que la histidina próxima F8 se acerque al anillo porfirínico casi en 60 pm. La histidina está situada entonces asimétricamente con respecto a dicho anillo y, el consiguiente aumento en las repulsiones de Van der Waals entre átomos no enlazados crea una interacción inestabilizante entre el anillo porfirina y la proteína globina. La molécula de la proteína relaja entonces la tensión introducida cambiando ligeramente las posiciones de varios grupos aminoácido vecinos.

Esto resulta en un cambio de ubicación de grupos cruciales en la superficie de una subunidad α , donde ésta interacciona (vía atracciones de Van der Waals, electrostáticas o de enlace de hidrógeno) con grupos apropiados de una subunidad β contigua. Este cambio, a su vez, desencadena un cambio conformacional en esta segunda subunidad (β) y, presumiblemente, varía ligeramente la posición de la histidina F8 sobre el correspondiente grupo hemo, resultando en un aumento de la afinidad por O₂ [1].

Podríamos resumirlo así: el cambio estructural terciario en las cadenas β (desencadenado por el O₂ ligado a una α) desplaza al respectivo imidazol próximo con respecto al plano de la porfirina, aliviando en algo la tensión (estérica o de otro tipo) asociada al movimiento del Fe^{II} requerido para formar el enlace Fe-O₂; de ahí la mayor afinidad por O₂ de esta forma R que la de la T.

La interacción hemo-hemo no es el único efecto alostérico en la hemoglobina. También se incluyen en esta categoría los efectos antes mencionados del pH, de la concentración de CO₂ y del DPG sobre la afinidad por O₂ de la hemoglobina [5].

La unión de O₂ a la cadena α de la Hb altera también la posición relativa de los restos aminoácido, histidina (E7) y valina (E11), sobre la cara distal

del grupo hemo en la cadena β , que es el lugar de unión para O_2 ó CO . Esto se refleja en los diferentes valores de $M = P_{1/2}(O_2)/P_{1/2}(CO)$ que es un índice de la preferencia relativa por CO y O_2 (a menor M , mayor preferencia por O_2) de la forma R ($M = 170$) y de la forma T ($M = 300$) [4].

DISCRIMINACION ENTRE OXIGENO Y MONOXIDO DE CARBONO EN LAS HEMOPROTEINAS

Existe una propiedad muy importante de la hemoglobina y mioglobina que es su capacidad discriminativa hacia CO y O_2 . *La afinidad por CO es mucho mayor que por O_2 , pero no tanto como debiera ser en términos de las fuerzas de enlace relativas $Fe^{II}-CO$ y $Fe^{II}-O_2$* . Así, por ejemplo, las constantes de equilibrio K , para las reacciones de la mioglobina humana con O_2 y CO son $7,7 \times 10^5$ y $4,7 \times 10^7$ respectivamente (pH 7,45; $20^\circ C$).

Esta es una función muy importante, ya que el CO es un veneno endógeno, producido por el propio organismo. Irónicamente, el CO es producido por el catabolismo de las hemoproteínas de eritrocitos viejos, por tanto, la Mb y Hb deben lidiar con un envenenamiento potencial de sus propios productos metabólicos. En la Figura 8 se indican los pasos involucrados en el catabolismo del grupo hemo que conducen a su conversión en bilirrubina (vía biliverdina) con liberación de CO y Fe^{III} (Fig. 8).

El catabolismo hemo produce una presión de CO de 3×10^{-3} torr en los tejidos, lo que causa que un 1-3% de la Mb y Hb liguen CO . *Si las afinidades por CO fueran unas 200 veces mayores, tendríamos que más de un 50% de la mioglobina y hemoglobina estarían envenenadas* [4, 10].

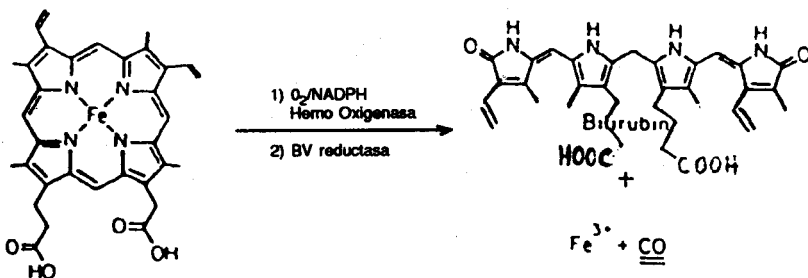


Fig. 8 Monóxido de carbono como toxina endógena para las proteínas hemo.

Esta capacidad de reconocimiento del sustrato por las proteínas hemo despertó un enorme interés y ha sido objeto de intenso estudio. Dada la uniformidad de la esfera de coordinación en torno al hierro (protoporfirina IX e imidazol) resulta sorprendente el amplísimo rango de afinidades por O₂ observado entre las hemoproteínas de diversas criaturas. La P_{1/2} (O₂) a temperatura ambiente varía de 0,002 torr para el nematodo *Ascaris* y 1 torr para la Mb de mamíferos, a 1000 torr para sangre ácida de trucha; este rango de 500000 demuestra claramente el enorme impacto que la proteína globina puede tener sobre la reactividad del hierro [4].

Los efectos de la globina pueden ser divididos en:

- distales: relacionados con interacciones especialmente de enlace de hidrógeno, pero también estéricas con el ligando diatómico, así como con la polaridad local en la cavidad hemo.
- proximales: relacionados con el imidazol de la histidina proximal (F8).

La existencia de **enlace de hidrógeno** entre el O₂ y el protón del imidazol distal (His E7) en la mioglobina oxigenada, fue demostrada en forma concluyente por un estudio de **difracción neutrónica**. En contraste con esta situación, en un estudio paralelo con MbCO se observó el tautómero alternativo del imidazol distal y la ausencia de enlace de hidrógeno, a pesar de los contactos aún muy cercanos (2,7Å) entre el ligando CO y el grupo imidazol. También se observó una inclinación sustancial o desplazamiento del grupo CO de una coincidencia con la normal al plano de la unidad hemo que pasa por el Fe^{II} central [11].

Si bien el enlace de hidrógeno en MbO₂ es relativamente débil, **juega un papel estabilizante muy importante sobre la unión del oxígeno al grupo hemo**, ausente en caso de MbCO, que explica en buena parte la reducción observada en la brecha de afinidades relativas del hierro al O₂ y CO. La debilidad del enlace de hidrógeno en MbO₂ se debe a la falta de una alineación óptima entre el enlace N-H y la entidad Fe-O-O (no son coplanares, sino que el enlace N-H está ubicado a un costado, de tal manera que hay una interacción oblicua con ambos, el O unido al Fe^{II} y el O terminal).

Reemplazo de la histidina distal por los restos aminoácido incapaces de formar enlace de hidrógeno glicina o valina (mutagénesis dirigida) causa una reducción de 10 veces en la afinidad por oxígeno [12].

Estudios de difracción de rayos X en MbO₂ y HbO₂ confirman la presencia del enlace de hidrógeno al imidazol distal. Más evidencia directa proviene del espectro EPR de oximioglobina sustituida por Co^{II} (en solución homogénea a temperatura ambiente), que indica una rotación restringida del O₂ en torno al enlace Co^{II}-O, presumiblemente por enlace de hidrógeno a la His E7 [13].

Por último, se tiene diversa evidencia indirecta de la existencia del enlace de hidrógeno y su rol en aumentar la afinidad por O₂ del grupo hemo por espectroscopía IR, de resonancia Raman, de ¹⁷O-RMN, así como datos cinéticos.

El hecho que dicho enlace esté presente en caso de los complejos oxo mas no carbonilos, se debe a que el grupo Fe-O₂ está sustancialmente polarizado, con una carga parcial negativa en el O₂, mientras que el grupo Fe-CO prácticamente no lo está. Justamente esta significativa *separación de carga en el arreglo Fe-O₂* (que causa un aumento en el momento dipolar neto del complejo hexacoordinado) *es responsable también de que un ambiente polar en la inmediata cercanía a la posición donde coordina el O₂ ó el CO₂ como el proporcionado por el grupo imidazol distal en las hemoproteínas, aumente fuertemente la afinidad por O₂ mas no por CO*. Relacionado con esto se encuentra el efecto de una creciente polaridad del solvente que aumenta la afinidad por O₂ y más bien disminuye aquélla por CO. Esto último se debería a que la unión del CO involucra una disminución en el momento dipolar neto del complejo [4].

En relación a los efectos estéricos de la proteína globina, tenemos que la desviación de la linealidad del arreglo Fe^{II}-C-O en MbCO (Fig. 9) observada también en HbCO (ángulos Fe-C-O=145°), es atribuida a las restricciones estéricas impuestas por los grupos distales histidina (E7) y valina (E11). Esta **distorsión del arreglo lineal ideal conduce a un debilitamiento del enlace Fe^{II}-CO** y por tanto, a una reducción en la afinidad por CO en las hemoproteínas. En cambio, el arreglo angular ideal Fe^{II}-O-O se preserva en las hemoproteínas, por lo que en este sentido su afinidad por O₂ no se ve alterada. Una variedad de proteínas hemo tiene sitios de enlace cuidadosamente “esculpidos” para que encaje el O₂ angular, pero que distorsionan el normalmente lineal CO, lo que constituye un mecanismo discriminativo: *el enlace a CO es desestabilizado por interacciones estéricas mientras que aquél a O₂ no se ve afectado* [4].

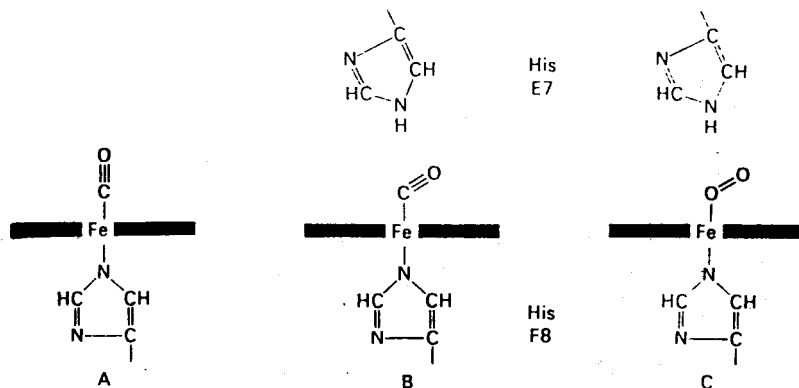


Fig. 9 Base estructural de la disminuída afinidad por CO de la Hb y Mb

BIBLIOGRAFIA

1. Ei-Ichiro Ochiai. **General Principles of Biochemistry of the Elements** - 1ra. Edición 1987 (Plenum Press).
2. Robert W. Hay. **Bio-Inorganic Chemistry** - 1ra. Edición (1984) - (Ellis Horwood Limited).
3. Ei-Ichiro Ochiai. **Química Bioinorgánica: Una introducción.** (Editorial Reverté S.A. 1985).
4. Suslick. K.S., Reinert T.J. (1985). *J. Chem. Ed.* **62**, 974-983.
5. Lubert Stryer. **Biochemistry** - W.H. Freeman and Company/New York - 3ra. Edición 1988.
6. Oertling, W.A., Kean, R.T., Weber, R., Babcock, G.T. (1990). *Inorg. Chem.*, **29**, 2642-2644.
7. M.N. Hughes. **The Inorganic Chemistry of Biological Processes.** John Wiley Sons - 2da. Edición (1981).
8. Wagner, W.D., Paeng, I.R., Nakamoto, K. (1988). *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5565-5567.
9. Traylor, T.G., White, D.K., Campbell, D.H., Berzinis, A.P., (1981). *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4932.
10. Balch, A.L., Noll, B.C., Safari, N., (1993). *Inorg. Chem.* **32**, 2901.
11. Jameson, G.B., Drago, R.S., (1985). *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3017-3020.
12. Wuenschell, G.E., Tetreau, C., Lavalette D., Reed C. A., (1992). *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3354.
13. Walker, F.A., Bowen J., (1985). *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 7632-7634.