

LA HEMOGLOBINA: UNA MOLÉCULA PRODIGIOSA

LUIS FRANCO VERA*

* Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Valencia. luis.franco@uv.es

A primera vista, el adjetivo *prodigiosa*, que, referido a la molécula de hemoglobina aparece en el título de la presente contribución, puede parecer poco científico. Se piensa con demasiada frecuencia que la ciencia ha de ser una actividad fría, desprovista de emociones y no hay nada más lejos de la realidad. En octubre de 1989 el Profesor Severo Ochoa pronunció una conferencia en Valencia con el sugerente título “La emoción de descubrir”. La conferencia empezó así:

«Quisiera hoy discurrir sobre la satisfacción que puede producir el dedicar la vida a la investigación científica. Pocas veces he sentido emoción más intensa que cuando creí haber hecho descubrimientos de alguna trascendencia».

Y algunos años antes, Konrad Lorenz escribía:

«Es un desatino decir que la investigación positiva, la Ciencia, el conocimiento de las relaciones naturales, menguan el placer que procuran las maravillas de la Naturaleza».

Pueden bastar estos testimonios de dos científicos, galardonados con el premio Nobel, para ilustrar la tesis de que ni la producción científica ni su diseminación tienen que carecer de las mismas sensaciones que experimentamos ante un objeto bello, ante una noticia sorprendente, ante una experiencia satisfactoria. Tanto el científico como el estudiante de ciencia pueden entusiasmarse ante el objeto de su estudio, de su *contemplación*. Es más, son muchos los autores que consideran esta actitud como un requisito esencial para producir o asimilar la ciencia de calidad. Por tanto, sí pueden tener cabida en el léxico del científico calificativos como *asombroso*, *admirable*, *sorprendente*, *prodigioso*..., adjetivos todos que bien pueden aplicarse a

la molécula objeto del presente artículo, la hemoglobina. Sólo desde esa perspectiva se comprende que el estudio de esta molécula haya atraído la atención de los investigadores hasta el punto de que el número de publicaciones sobre ella crezca ininterrumpidamente, para superar en la actualidad los 6 000 artículos anuales (Fig. 1).

Si se tiene en cuenta tal abundancia de información, es evidente que resulta imposible revisar ni tan siquiera una mínima parte de lo que hoy se conoce sobre la hemoglobina. Por eso, este artículo sólo pretende presentar algunas de sus propiedades elementales, que la capacitan para desempeñar una función

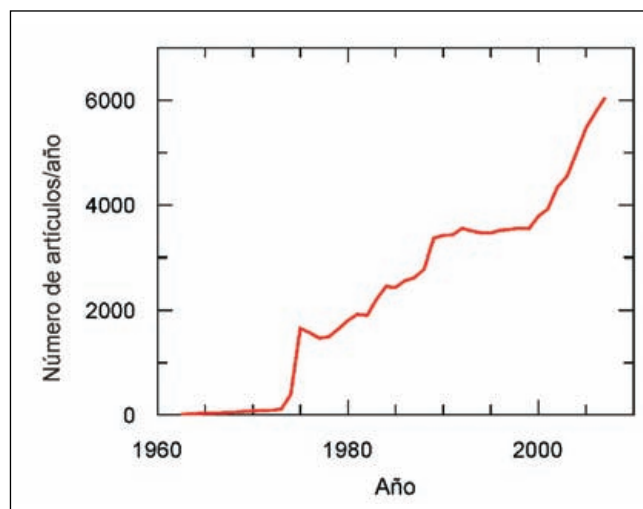
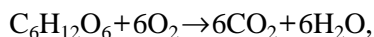


Figura 1. Evolución temporal de las publicaciones científicas sobre hemoglobina. La representación recoge el número total de artículos que tratan de hemoglobina recogidos cada año en la base de datos PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

esencial para la vida de todos los vertebrados y de algunos invertebrados: el transporte de oxígeno. Esa presentación se hará desde una perspectiva molecular. Efectivamente, si se quiere llegar al fondo de las causas del comportamiento de los sistemas biológicos, hay que descender al nivel molecular, para comprender cómo ese comportamiento biológico viene determinado por los cambios —químicos o estructurales— que experimentan las biomoléculas.

EL TRANSPORTE DE OXÍGENO POR LA SANGRE

Todos los organismos superiores son estrictamente aerobios; necesitan indispensablemente el oxígeno. Se debe a Lavoisier, que descubrió el oxígeno en 1778, la idea de que la respiración animal equivale a una combustión lenta, en la que el carbono de la materia orgánica se transforma en CO_2 con el correspondiente consumo de oxígeno. Realmente, el proceso es más complicado y no se acabó de aclarar hasta mediado el siglo XX. La materia orgánica, con algunas escasas excepciones, no se oxida directamente por el oxígeno atmosférico, sino por distintas coenzimas, que quedan reducidas en consecuencia. El oxígeno molecular se emplea para reoxidar esas coenzimas, un proceso que en los organismos eucarióticos tiene lugar en las mitocondrias y recibe el nombre de cadena respiratoria. Pero, en cualquier caso, el balance de la oxidación equivale al de una combustión, como anticipó Lavoisier. Por ejemplo, la oxidación completa de la glucosa obedece globalmente al esquema estequiométrico:



por más que el mecanismo real sea muy complicado e implique docenas de reacciones, incluidas las de la cadena respiratoria.

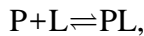
Los vertebrados terrestres captan el oxígeno a través de los pulmones y han de transportarlo a todos los órganos, puesto que todos ellos lo requieren para la cadena respiratoria. El vehículo mediante el que se produce el transporte es la sangre. La compleja red del sistema circulatorio, que en un adulto humano llega a alcanzar los 96 000 km de longitud si se suma la de todas las arterias, venas y vasos, asegura la llegada del oxígeno a todas y cada una de las células, cuyo número

está comprendido entre 10 y 100 billones. Pero se presenta una importante dificultad para este transporte. La molécula de dioxígeno, O_2 , es muy apolar y como el 79% de la sangre es agua, la cantidad de oxígeno que se puede transportar disuelto en la sangre representa sólo el 2% del requerido. Para transportar el 98% restante del oxígeno, se utiliza la hemoglobina, una proteína de peso molecular 68 000, que puede cargarse con 4 moléculas de dioxígeno. Aquí se aprecia ya un dato sorprendente: teniendo en cuenta que el peso molecular de la molécula de dioxígeno es 32, la relación entre la masa transportada y la del transportador es de 1:531. La situación equivaldría a la de un camión de 8 Tm, que sólo pudiera llevar una carga de 15 kg. Estos números, ¿son el resultado de lo que podríamos llamar *un fracaso de la naturaleza?*, o, por el contrario, ¿reflejan una precisa función para cuyo desempeño se requiere ese aparente derroche? Los datos que irán apareciendo a lo largo del presente artículo permitirán decidir que la segunda opción es la que responde a la realidad.

El examen microscópico de la sangre, como es bien sabido, revela que una fracción importante de su volumen, que se aproxima al 50%, está ocupado por células. De estas, las más abundantes son los eritrocitos o hematíes, vulgarmente conocidos como glóbulos rojos, de los que hay entre 4,7 y 6,1 millones por mm^3 en los varones y entre 4,2 y 5,4 en las mujeres, con lo que, si se tiene en cuenta que el volumen de sangre en un adulto ronda los 5 l, resulta la fabulosa cantidad de unos 25 billones de eritrocitos por persona adulta. Los eritrocitos son unas células de apariencia discoidal, algo hundidas por su región central y con un diámetro de unos 7,1 μm . Su organización es extremadamente simple: no contienen ningún orgánulo subcelular, son células carentes de DNA, y por tanto, genéticamente inactivas y su metabolismo es muy sencillo. Sólo son capaces de realizar la glicolisis hasta lactato y algunas reacciones de la ruta de las pentosas. Su función primordial es la de almacenar la hemoglobina, de la que cada uno llega a encerrar 270 millones de moléculas, que se encuentran en un alto grado de compactación. De este modo, el número total de moléculas de hemoglobina presentes en un ser humano adulto es de alrededor de 6 750 trillones. La sangre contiene, además de los eritrocitos, una cantidad mucho más pequeña de leucocitos —los populares glóbulos blancos—, implicados mayorita-

riamente en funciones inmunes y de defensa, y las plaquetas, células esenciales para la coagulación sanguínea. Como ninguna de estas células está involucrada en el transporte de oxígeno, no se harán más referencias a ellas en este artículo.

Como se verá más adelante, la unión de oxígeno a la hemoglobina es reversible y sigue los principios generales de las interacciones proteína-ligando,



que se rigen por las leyes del equilibrio químico. Esto hace que en los pulmones, en los que al estar en contacto directo con el aire, la presión parcial de oxígeno es elevada, del orden de 100 torr, el equilibrio se desplace hacia la unión del oxígeno, que forma un complejo con la hemoglobina. En los tejidos, no accesibles directamente al aire atmosférico, la presión parcial de oxígeno es más baja y el equilibrio revierte, con la consiguiente liberación de oxígeno. Un caso paradigmático es el del músculo, en cuyas células abunda la mioglobina —una molécula relacionada estructural y evolutivamente con la hemoglobina—, también capaz de ligar dioxígeno y con mayor afinidad que la hemoglobina. Por eso, el oxígeno liberado por esta se une a la mioglobina hasta su utilización.

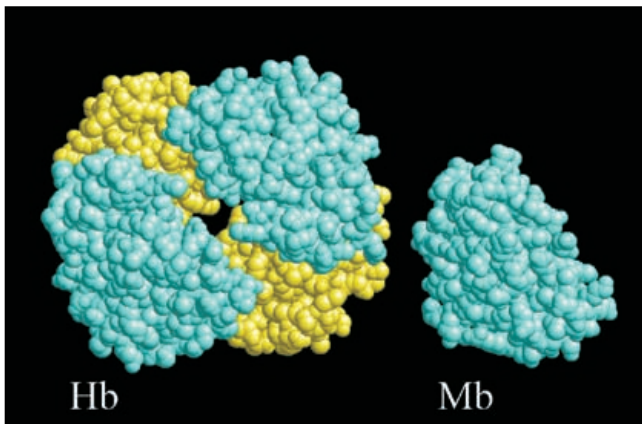


Figura 2. Comparación de las estructuras de la hemoglobina (Hb) y de la mioglobina (Mb) humanas. La figura está construida con el programa RasMol a partir de los datos de Fermi y Perutz (1984) para la hemoglobina y de Kondrashov *et al.* (2008) para la mioglobina. En la hemoglobina, que se ve desde el eje binario de simetría, las cadenas α están coloreadas en amarillo y las β en azul.

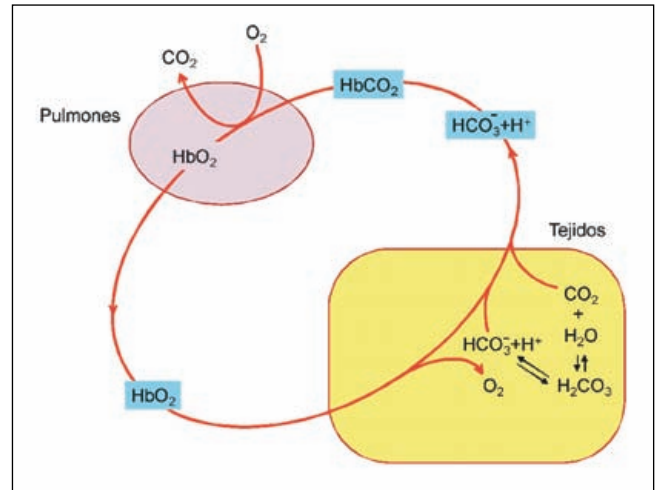


Figura 3. Representación esquemática del transporte de gases entre los pulmones y los tejidos. Véase el texto para más detalles.

La figura 2 reproduce la estructura de ambas proteínas, hemoglobina y mioglobina. La primera está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos α y dos β , mientras que la mioglobina posee una única cadena polipeptídica. Aunque luego habrá ocasión de contemplarlo con más detalle, ya se puede adelantar —y se pone de manifiesto en la figura 2— que la estructura terciaria de la mioglobina es muy parecida a la de las cadenas de la hemoglobina.

Volviendo a los aspectos funcionales, la hemoglobina transporta O_2 desde los pulmones hasta los tejidos, donde puede o no almacenarse temporalmente unido a la mioglobina hasta su utilización. Como se ha comentado antes, esta utilización, en último término, produce CO_2 , que, al disolverse en el medio acuoso intracelular, produce ácido carbónico. Se trata de una reacción que se produce de modo espontáneo, aunque una enzima, la anhidrasa carbónica, facilita aún más la reacción desde un punto de vista cinético. El ácido carbónico es un ácido diprótico, cuyos valores de pK_a son 3,60¹ y 10,33. Como consecuencia, en el medio intracelular se encuentra fundamentalmente en forma del anión bicarbonato, HCO_3^- , lo que conlleva la pérdida de un protón. Todas estas reacciones que tienen lugar en los tejidos se esquematizan en la figura 3. El CO_2 se transporta desde los tejidos hacia los pul-

¹ El valor que aquí se da es estrictamente el del ácido carbónico. Pero hay que tener en cuenta que en medio acuoso la especie química H_2CO_3 sólo existe en equilibrio con el CO_2 , por lo que la concentración real del ácido es menor y el pK_a para la mezcla real es mayor. De todas formas, eso no es obstáculo para que la especie más abundante en el medio fisiológico sea el anión bicarbonato, como se comenta en el texto.

mones de dos formas: una parte, como ion bicarbonato disuelto en el plasma sanguíneo; otra parte se une a la hemoglobina del modo que luego se verá. En los pulmones tienen lugar las mismas reacciones que en los tejidos, pero en sentido inverso debido a que la presión parcial de CO_2 es baja. La figura 3 también da cuenta esquemáticamente de este intercambio gaseoso.

ESTRUCTURA DE LA MIOGLOBINA Y LA HEMOGLOBINA

Se ha comentado ya algo acerca de la estructura de la hemoglobina y de la mioglobina y se apuntado que, mientras la estructura terciaria de la mioglobina recuerda a la de las cadenas de la hemoglobina, una diferencia esencial es que la mioglobina carece de estructura cuaternaria. Ahora es el momento de profundizar en las diferencias y similitudes entre ambas proteínas. El examen de la estructura primaria de la mioglobina y de las dos cadenas de la hemoglobina sugiere un origen evolutivo común. Al alinear las secuencias de la mioglobina y la cadena α de la hemoglobina se encuentran 23 aminoácidos idénticos. Entre las dos cadenas de la hemoglobina, la identidad se eleva al 46% (66 residuos). La semejanza estructural se observa más aún en los niveles secundario y terciario (figura 4). Las tres cadenas poseen una elevada proporción de hélice α (alrededor del 75%) y carecen totalmente de estructura β . Como se adelantó, puede observarse en la figura que las estructuras terciarias de las tres cadenas son prácticamente superponibles. Hay

que tener en cuenta que, por ejemplo, entre las cadenas α y β de la hemoglobina además de los 66 residuos idénticos hay otros 21 que corresponden a sustituciones conservativas. Todo ello hace posible que las estructuras secundarias y terciarias sean tan semejantes.

Siguiendo la propuesta de Watson y Kendrew (1961), es tradicional designar los 8 segmentos de hélice α de las cadenas de la mioglobina y hemoglobina mediante letras mayúsculas, ordenadas alfabéticamente desde A hasta H a partir del extremo N-terminal. Dentro de cada segmento de hélice, los diferentes residuos se numeran correlativamente de acuerdo con su secuencia. Cuando se habla, por ejemplo, de la histidina F8 se está haciendo referencia al octavo residuo contando a partir del extremo N-terminal de la hélice F. Los segmentos no helicoidales que se encuentran entre las distintas hélices se designan AB, BC, y así sucesivamente. Y los situados al inicio o al final de la cadena se identifican como NA y HC respectivamente, donde las letras N y C hacen referencia a los extremos N- y C-terminales de las cadenas.

Hay que tener en cuenta un detalle estructural fundamental del que no se ha hecho mención hasta ahora: la mioglobina y la hemoglobina son proteínas conjugadas y en ambos casos el grupo prostético es el hemo, o protoporfirina IX (figura 5). El grupo hemo es una molécula prácticamente plana. Su sistema de dobles enlaces conjugados hace que los electrones π estén

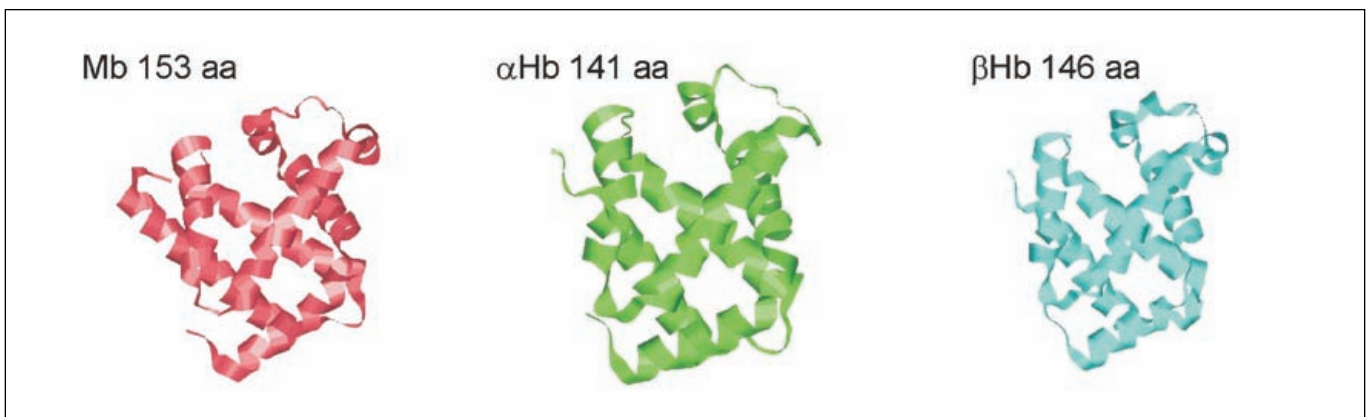


Figura 4. Comparación de las estructuras secundaria y terciaria de las dos cadenas de la hemoglobina y de la mioglobina humanas. La figura está construida con el programa RasMol a partir de los datos de Fermi y Perutz (1984) para la hemoglobina y de Kondrasov *et al.* para la mioglobina. Solo se recogen el esqueleto de las apoproteínas en forma de cintas, para visualizar mejor la estructura secundaria. Las tres imágenes están en la misma orientación y escala.

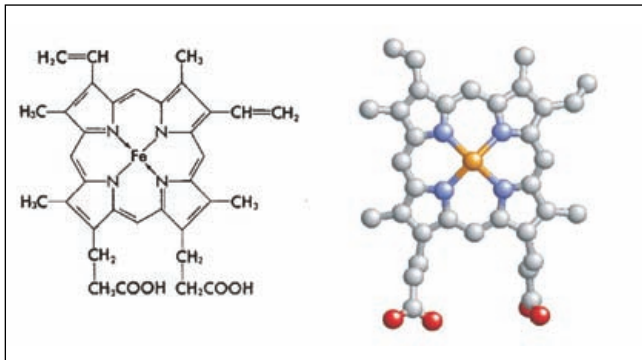


Figura 5. Estructura del grupo hemo. A la izquierda se aprecia la fórmula desarrollada, mientras que a la derecha aparece la estructura que el hemo adopta en la cadena β de la hemoglobina. Esta figura está construida con el programa RasMol a partir de los datos de Fermi y Perutz (1984). Para mayor claridad se ha adoptado un modelo de bolas y varillas, en el que los átomos de carbono aparecen en gris, los de nitrógeno en azul, los de oxígeno en rojo y el de hierro en naranja.

deslocalizados en ambas caras del plano. El hierro central es un ion Fe^{2+} , coordinado a los 4 nitrógenos de los anillos pirrólicos. Con la salvedad de este ion y de los dos carboxilatos de las cadenas laterales, el conjunto de la molécula es bastante apolar.

El ion Fe^{2+} tiene posibilidad de formar 6 enlaces de coordinación, con una geometría octaédrica. Los cuatro formados con los nitrógenos de los anillos pirrólicos se dirigen aproximadamente desde el centro hacia los vértices de un cuadrado, por lo que los dos restantes pueden dirigirse en dirección perpendicular al plano del hemo, uno a cada lado. Uno de estos enlaces precisamente se emplea para unir el grupo hemo firmemente a la apoproteína, concretamente a través de un nitrógeno del imidazol de un residuo de histidina. La figura 6 muestra la disposición del hemo en una cadena β de la hemoglobina, aunque, dada la similitud entre ambas cadenas y de ellas con la mioglobina, la figura 6 sirve también, en general, para ilustrar la posición del grupo hemo en la cadena α y en la mioglobina. La histidina que establece el quinto enlace de coordinación con el hemo es la F8². Al otro lado del plano se encuentran los residuos de fenilalanina CD1 y valina E11, que proporcionan un entorno apolar adecuado para el acoplamiento del hemo y, como se verá inmediatamente, para la entrada

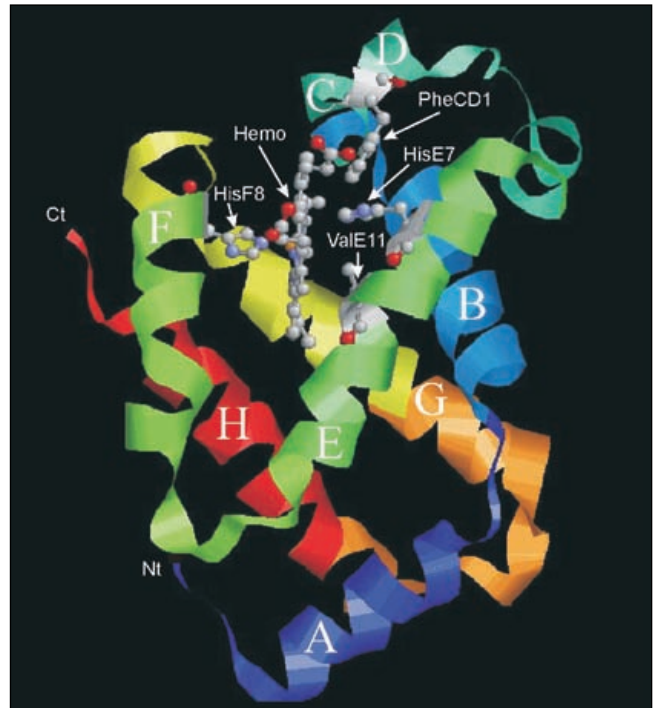


Figura 6. Estructura de la cadena β de la hemoglobina. La representación es equivalente a la de la figura 4, pero muestra además la localización del grupo hemo y los aminoácidos con que interacciona.

de la molécula apolar de dióxigeno. Como se aprecia también en la figura, los carboxilatos del hemo se proyectan hacia la superficie de la molécula, que está en contacto con el medio polar. En conjunto, se puede decir que el grupo hemo ocupa una hendidura, delimitada por las hélices E y F que están orientadas en forma de V abierta hacia la superficie de la molécula.

La unión de la molécula de dióxigeno tiene lugar por medio del sexto enlace de coordinación del hierro hemínico, como se muestra en la figura 7. Como consecuencia de esta unión, la molécula de dióxigeno se polariza lo suficiente como para establecer un enlace de hidrógeno con el imidazol protonado de la histidina E7. Así pues, hay dos histidinas importantes en el entorno del hemo, la F8 y la E7, que frecuentemente se designan como proximal o distal, respectivamente, atendiendo a su distancia al grupo hemo. Se puede unir una molécula del ligando a cada uno de los cuatro grupos hemo, de donde resulta la estequiometría, ya

² El sistema de identificación de los residuos al que antes se ha aludido tiene una ventaja: aunque el lugar que ocupa en la secuencia varía de una cadena a otra, dada la homología de las cadenas de la hemoglobina y de la mioglobina, en los tres casos el residuo F8 es una histidina y es la que está coordinada con el hemo.

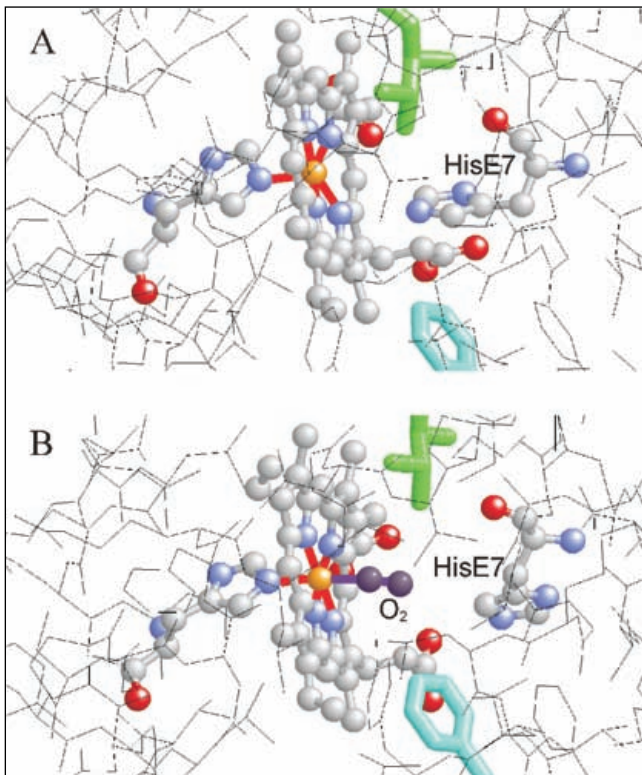
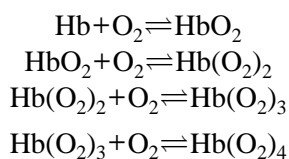
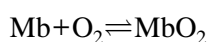


Figura 7. Entorno del grupo hemo en la cadena β de la hemoglobina. Se observa con detalle el grupo hemo y su entorno en las formas desoxigenada (A) y oxigenada (B) de la hemoglobina. Además de la histidina distal marcada en la figura (E7) se aprecian las cadenas laterales de la histidina proximal en color CPK, de la valina E11 (verde) y de la fenilalanina CD1 (azul). Los átomos de oxígeno orgánicos están coloreados con el código CPK (rojo), pero los de la molécula de dióxigeno se representan en color morado. La orientación de la figura implica un giro de 180° alrededor de un eje horizontal con respecto a la figura 6.

adelantada, de 4 moléculas de dióxigeno a cada molécula de hemoglobina. La unión puede describirse por una serie de 4 equilibrios consecutivos:



en la que Hb representa la *desoxihemoglobina*, o hemoglobina totalmente desoxigenada, mientras que la forma totalmente cargada con el ligando, $\text{Hb}(\text{O}_2)_4$, suele denominarse *oxihemoglobina*. En la mioglobina el oxígeno se une del mismo modo, aunque, como sólo existe un grupo hemo por molécula, sólo se da un único equilibrio:



La unión del O_2 a la hemoglobina está acompañada de unos sutiles cambios en el grupo hemo y en su entorno. En primer lugar, el hierro en la desoxihemoglobina se encuentra en un estado de espín alto ($S=2$), mientras que en la oxihemoglobina el estado de espín es bajo ($S=0$) (Perutz, 1990). Otros cambios se aprecian claramente en la figura 7. Por ejemplo, en la desoxihemoglobina el hierro no es perfectamente coplanar con el resto del grupo hemo y el conjunto adquiere una estructura algo abovedada. En la oxihemoglobina, por el contrario, el menor radio iónico del hierro permite su coplanaridad con el resto del grupo hemo (Perutz, 1970). Este desplazamiento del hierro conlleva un acercamiento de la histidina proximal al plano del grupo hemo: pasa de estar situada a $2,7 \text{ \AA}$ del plano a colocarse a una distancia de $2,1 \text{ \AA}$. Este desplazamiento de $0,6 \text{ \AA}$ de la histidina F8 arrastra la hélice F, que se aproxima así al grupo hemo, con las consecuencias que luego se comentarán.

Tanto la hemoglobina como la mioglobina son capaces de ligar monóxido de carbono del mismo modo que el oxígeno. El tamaño y apolaridad de las moléculas CO y O_2 son semejantes, así como su posibilidad de formar enlaces de coordinación con el hierro del grupo hemo. Esta semejanza hace que el CO sea un potente inhibidor competitivo de la unión de oxígeno. Como, por otro lado, la disociación del CO es muy difícil, el monóxido de carbono posee una elevada toxicidad.

COOPERATIVIDAD EN LA UNIÓN DE OXÍGENO A LA HEMOGLOBINA

La curva de unión de oxígeno a la hemoglobina es sigmoide (Fig. 8), lo que está relacionado con el hecho de que el ligando se une de modo cooperativo, es decir, la unión de oxígeno favorece su ulterior unión. En el caso de la mioglobina, al poseer un único centro de unión de oxígeno no cabe hablar de cooperatividad y la curva de saturación es hiperbólica, como también se muestra en la figura 8.

La cooperatividad en la unión de oxígeno a la hemoglobina es de la máxima importancia funcional. Puede verse en la figura 8 que la saturación de la proteína por su ligando es prácticamente del 100% para una presión parcial de oxígeno de 100 torr, es decir, la

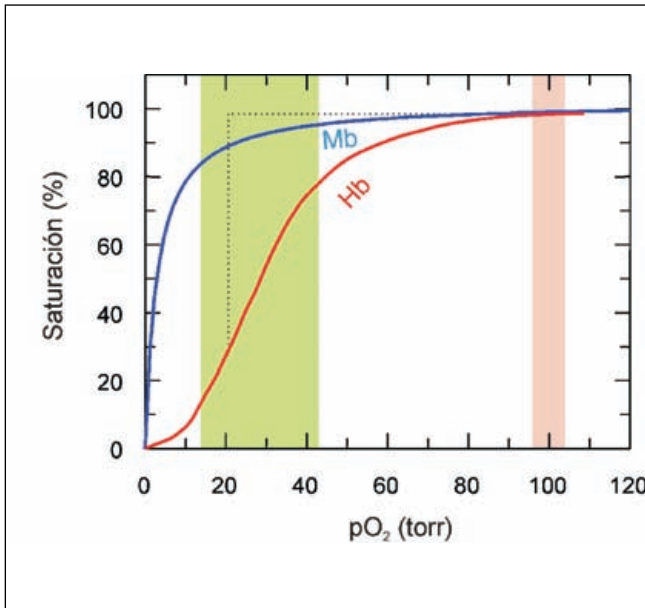


Figura 8. Curvas de unión de dióxígeno a la mioglobina y a la hemoglobina. Se representa la saturación porcentual en función de la presión parcial de oxígeno. La franja sombreada en rosa indica la presión parcial de oxígeno en los pulmones a nivel del mar. La franja sombreada en verde indica el intervalo de presiones parciales de oxígeno en los tejidos periféricos.

presión parcial de ese gas que existe en los pulmones. En consecuencia, la hemoglobina sale de los pulmones cargada de un modo casi total. En los tejidos periféricos la presión parcial de oxígeno oscila aproximadamente entre 15 y 45 torr, dependiendo del tipo de tejido y de su actividad metabólica. Por ejemplo, en las fibras musculares en reposo, con sólo una actividad metabólica basal, la presión parcial de oxígeno está próxima al límite superior, mientras que durante un ejercicio violento, en el que la actividad metabólica es muy intensa para proporcionar todo el ATP requerido para la contracción muscular, el consumo de oxígeno es elevado y, por tanto, su presión parcial es baja.

Es evidente que un transportador ideal debe liberar tanto más oxígeno cuanto mayor sea la demanda que exista de él. Por seguir con el ejemplo del párrafo anterior, en el músculo en reposo basta con liberar una pequeña cantidad de oxígeno, cantidad que habrá de rondar la máxima posible en un caso de ejercicio violento. Pues bien, como se ha comentado anteriormente, las leyes del equilibrio hacen que éste se desplace hacia la liberación de oxígeno en los tejidos y la figura 8 proporciona una forma de cuantificar esta liberación. Por ejemplo, en un tejido cuya presión parcial de

oxígeno fuera 20 torr, la hemoglobina sólo retiene aproximadamente el 30% de oxígeno y, si se había cargado al 98% en los pulmones (véanse las líneas de puntos en la figura 8), la cantidad liberada será el 68%. Por el contrario, en condiciones de baja demanda de oxígeno, por ejemplo, cuando la presión parcial es de 40 torr, la hemoglobina retiene aún un 75% y, por tanto la cantidad liberada será aproximadamente el 23%. El examen de la figura 8 pone de manifiesto que este comportamiento es posible gracias a la forma sigmoide de la curva de saturación, es decir, gracias a la cooperatividad con la que la hemoglobina une el oxígeno. En efecto, si su curva de saturación fuera como la de la mioglobina, aunque la proteína se cargaría totalmente en los pulmones, la cantidad retenida a presiones parciales de oxígeno comprendidas entre 20 y 40 torr sería superior al 90% o, dicho con otras palabras, la cantidad liberada sería muy pequeña. La forma sigmoide de la curva de saturación de la hemoglobina, en la que la región de máxima pendiente tiene lugar precisamente en el intervalo 15-45 torr, asegura que la respuesta de la hemoglobina a la demanda de oxígeno —medida por la presión parcial existente en cada lugar— es la adecuada para un transporte ideal.

Por otro lado, la comparación de las curvas de saturación de la hemoglobina y de la mioglobina explica por qué en los músculos el oxígeno liberado por la primera queda unido a la segunda: es una cuestión de afinidad por el ligando, mayor en el caso de la mioglobina como muestra la figura 8.

Así pues, la estructura tetramérica de la hemoglobina permite la existencia de cooperatividad, circunstancia que hace de esa proteína un transportador ideal. Pero para que haya cooperatividad en la unión de ligando a una proteína no basta con que haya más de un sitio de unión. Se precisa que haya una *comunicación* entre ellos, de modo que un sitio detecte si hay otros ocupados o no y la afinidad de la unión de ligando se ajuste en consecuencia. Dicho de otro modo, cuanto se ha considerado en este apartado explica por qué la conducta cooperativa de la hemoglobina representa una ventaja fisiológica para su actuación como proteína de transporte, pero no explica las causas de la cooperatividad. Más adelante se dará una explicación molecular de la cooperatividad, pero antes es preciso seguir describiendo las propiedades de la hemoglobina.



Figura 9. Christian Bohr (1855-1911).

EL EFECTO BOHR

Christian H. L. P. E. Bohr (1855-1911), fisiólogo danés y padre del físico Niels Bohr (Fig. 9), descubrió en 1903 que la sangre retenía menos oxígeno cuanto más bajo era su pH. En términos actuales, se puede decir que la unión del oxígeno a la hemoglobina está regulada por el pH sanguíneo, de modo que un descenso de pH disminuye la afinidad de la proteína por su ligando (Fig. 10). Si se observa de nuevo la figura 3, se recordará que el CO_2 producido en los tejidos como consecuencia de la actividad metabólica acaba convirtiéndose en ácido carbónico, que se disocia liberando protones, es decir, bajando el pH del medio en que se produce la reacción. Estos procesos tienen lugar también en el propio eritrocito, como se recoge en la figura 11. El CO_2 que se produce en los tejidos pasa en parte a la sangre y, por difusión, se introduce en los eritrocitos. Evidentemente, cuanto mayor sea la actividad metabólica de los tejidos, tanto mayor es la cantidad de CO_2 que se produce y, en consecuencia mayor es la disminución del pH de los eritrocitos. El efecto Bohr permite de esta manera que la hemoglobina libere más oxígeno cuanto mayor sea la actividad metabólica de un tejido. La ventaja fisiolo-

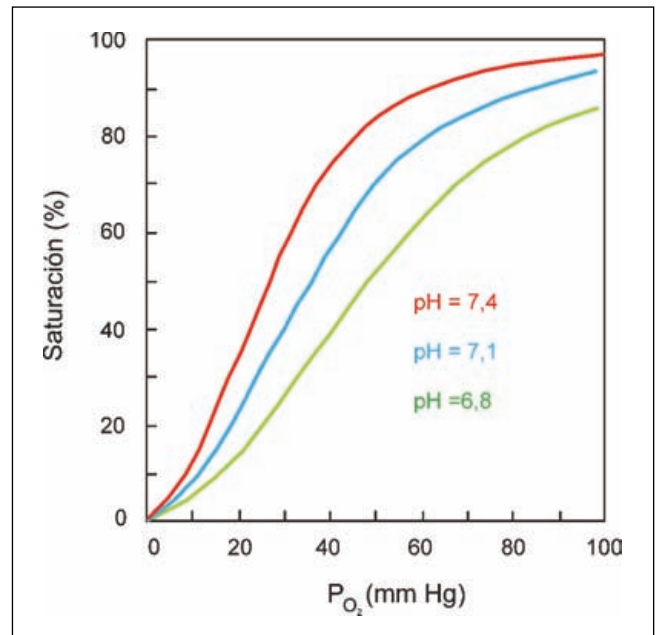


Figura 10. Influencia del pH sobre la unión de dioxígeno a la hemoglobina. Se aprecia la variación de la saturación de la hemoglobina por oxígeno al variar el pH (efecto Bohr).

lógica de la existencia del efecto Bohr es, pues, fácil de entender. Pero, como se decía al principio de este artículo, profundizar en las causas del comportamiento de los sistemas biológicos, implica llegar al nivel molecular. En este caso, será necesario comprender el mecanismo por el que un descenso de pH hace que el

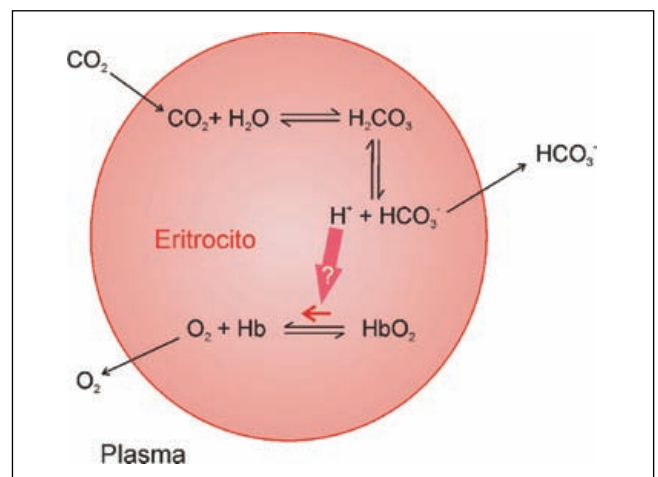


Figura 11. Esquema del intercambio gaseoso en el eritrocito. Se pone de manifiesto el desplazamiento de la unión de oxígeno a la hemoglobina al descender el pH (efecto Bohr). El mecanismo molecular responsable del efecto Bohr se estudia más adelante en el texto. Por esa razón el desplazamiento del equilibrio de unión Hb-O_2 se señala con un signo de interrogación en la figura.

equilibrio de unión de las moléculas de dioxígeno a la hemoglobina se desplace en el sentido de su disociación. En otras palabras, es preciso despejar el interrogante que, de una forma gráfica, se recoge en la figura 11, cuestión que se abordará más adelante.

EFFECTOS DEL 2,3-BPG

En 1967 se describió que el 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG), un compuesto con elevada densidad de carga negativa, como se aprecia en la figura 12, actuaba como un inhibidor de la unión del oxígeno a la hemoglobina (Benesch y Benesch, 1967). En efecto, al aumentar la concentración de 2,3-BPG disminuye la saturación de la hemoglobina por oxígeno (Fig. 13). El 2,3-BPG se había descubierto años atrás como componente de los eritrocitos y, al analizar la sangre de diferentes etnias, se había encontrado que los habitantes de las altiplanicies andinas poseían una concentración muy alta de ese compuesto, por lo que inicialmente se creyó que constituiría un marcador característico de ese grupo étnico. Pero cuando se analizaron con detalle las curvas de unión de oxígeno a la hemoglobina en presencia de concentraciones normales y elevadas de 2,3-BPG, se pudo comprobar que su efecto inhibitorio constituye la base de una excelente adaptación a la altura. Efectivamente, a una altura elevada sobre el nivel del mar, por ejemplo, 4 000 m, la reducida presión atmosférica hace que la presión parcial de oxígeno en los pulmones se sitúe en torno a 60 torr, en vez del valor de 100 torr antes considerado, que es válido al nivel del mar. Pues bien, al observar la

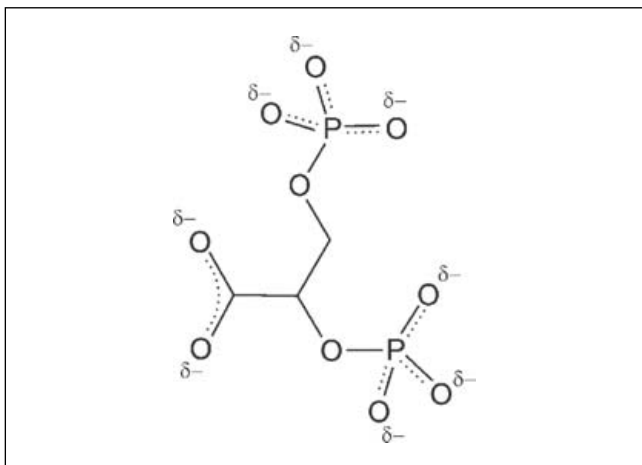


Figura 12. Estructura del 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG).

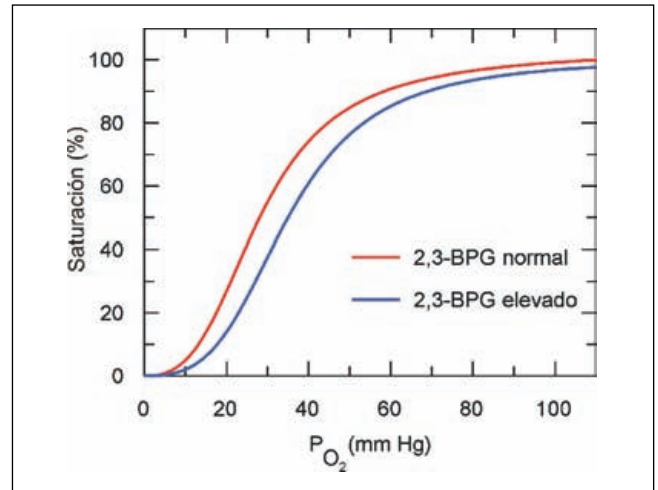


Figura 13. Efecto del 2,3-BPG sobre la unión de oxígeno a la hemoglobina. Se representan dos curvas de saturación, una en presencia de una concentración normal de 2,3-BPG (4,5 mM), como la que tiene una persona que habite al nivel del mar, y la otra en presencia de una concentración elevada del efector (5,8 mM), característica de los habitantes de las altiplanicies andinas.

figura 14, que es una repetición de la anterior con algunas precisiones, se ve que en una persona con un nivel normal de 2,3-BPG en su sangre que se encuentre al nivel del mar la hemoglobina se carga con oxígeno en sus pulmones prácticamente al 100%, como se ha visto antes. En un tejido cuya presión parcial de oxígeno sea un poco inferior a 40 torr la saturación de la hemoglobina es solo del 70% aproximadamente. Eso significa que la hemoglobina libera en ese tejido un 30% de oxígeno, en términos de su capacidad total, como indica la barra roja en la figura 14. Si esa persona se traslada a una altura de 4 000 m y la presión parcial de oxígeno en sus pulmones es algo inferior a los 60 torr, la hemoglobina se cargará sólo al 90% y, por tanto, al llegar al tejido en cuestión, donde la saturación es del orden del 70% liberará solo un 20% de su capacidad total (barra roja de trazos). En otras palabras, al pasar del nivel del mar a 4 000 m de altura, la cantidad de oxígeno transportada a los tejidos disminuye a los dos tercios de la que se transportaría inicialmente. Este es el origen del malestar que sufren las personas que se trasladan a un lugar de gran altura sobre el nivel del mar, el conocido soroche o mal de altura. El déficit de transporte de oxígeno a las células del sistema nervioso central provoca mareo, cefalea y, en algunos casos, irritabilidad. Por su parte, el déficit en los músculos es el causante de atonía y cansancio generalizados.

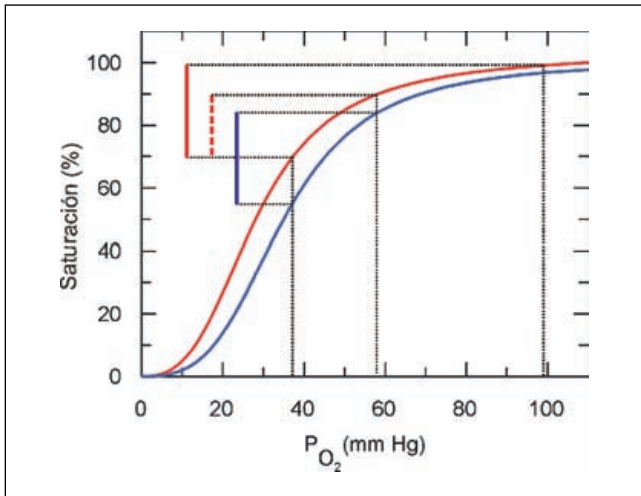


Figura 14. Función del 2,3-BPG. Sobre las curvas de la figura 13 se han añadido detalles para comprender la función del 2,3-BPG en la adaptación a la altura. La barra vertical roja representa la cantidad de oxígeno liberada en un tejido cuya presión parcial de ese gas sea de 37 torr, por una persona que, con una cantidad normal de 2,3-BPG respire a nivel del mar. La barra vertical roja de trazos es la cantidad de oxígeno que liberaría en el mismo tejido esa misma persona situada rápidamente a 4 000 m de altura sobre el nivel del mar. La barra vertical azul corresponde a la cantidad de oxígeno liberada a 4 000 m de altura sobre el nivel del mar por una persona con una concentración elevada de 2,3-BPG. Véase el texto para más detalles.

Sin embargo, para una persona que posea una concentración elevada de 2,3-BPG en su sangre la curva de saturación de la hemoglobina es distinta. En la figura 14 se representa en color azul y en ella se puede observar que, si bien a 4 000 m de altura la hemoglobina se satura aún menos con oxígeno en los pulmones (del orden del 85%), la inhibición causada por el 2,3-BPG es más acusada en los tejidos³; en el ejemplo que se está usando y que viene precisado por las rectas punteadas en la figura 14, el oxígeno retenido en el tejido de referencia con una elevada concentración de 2,3-BPG está en torno al 55%, con lo que la cantidad transportada es equivalente a la que se transportaría a nivel del mar en un individuo con nivel de 2,3-BPG normal.

En contra de lo que se pensó en un principio, la concentración de 2,3-BPG en sangre no depende de características étnicas, sino que es consecuencia de un proceso de adaptación metabólica. Al cabo de un cierto

tiempo de estar a presión atmosférica baja, la concentración de 2,3-BPG aumenta y, de modo inverso, cuando se retorna a una situación de presión atmosférica alta, el nivel de ese compuesto vuelve a los valores normales. De este modo, la ventaja fisiológica que proporciona el efecto inhibitor del 2,3-BPG resulta evidente: se trata de un mecanismo de adaptación a las alteraciones de presión atmosférica, como las que siguen a las variaciones grandes de altura sobre el nivel del mar.

LA EXPLICACIÓN MOLECULAR

En los párrafos precedentes se han descrito tres propiedades de la unión de oxígeno a la hemoglobina: la existencia de cooperatividad, el efecto Bohr, es decir, la influencia del pH en la curva de saturación y el efecto inhibitor del 2,3-BPG. Además, se han puesto de manifiesto las ventajas fisiológicas que reportan esas propiedades. Pero esta descripción no basta, y tampoco es suficiente que se comprendan las ventajas de tal comportamiento. Si se quiere profundizar científicamente en un proceso biológico, hay que buscar sus causas y, como ya se ha comentado, es preciso llegar al nivel molecular para comprender con profundidad esas causas. De este modo, cabe ahora plantearse una triple pregunta: ¿qué tiene la molécula de hemoglobina para que haya cooperatividad en la unión de oxígeno; para que esta venga influenciada por las variaciones de pH; para que sea inhibida por el 2,3-BPG?

A lo largo del tiempo, se han intentado dar muchas respuestas a esa triple pregunta o, al menos, a alguna de sus partes. Por ejemplo, Hill elaboró hace un siglo el primer modelo que intentaba explicar la cooperatividad. Pero el modelo de Hill se quedó en una simple descripción matemática de la cooperatividad, sin dar una interpretación molecular del fenómeno. La forma general actual de la ecuación de Hill es:

$$\bar{v} = \frac{nK[L]^{cn}}{1 + K[L]^{cn}} \quad [I]$$

En la ecuación [I] \bar{v} representa la función de saturación, $[L]$ la concentración de ligando, n es el número

³ Hay una clara razón geométrica para esta diferencia, ya que, como se ha comentado antes, el carácter sigmoide de la curva hace que el tramo de mayor pendiente se sitúe precisamente en la zona correspondiente a la presión parcial de oxígeno habitual en los tejidos.

de sitios de unión de ligando por cada molécula de proteína, c_H indica el *coeficiente de Hill* y K es una constante que carece de significado físico⁴. La función de saturación es una magnitud que se emplea en el estudio de las interacciones proteína-ligando para evaluar el nivel de unión de ligando a una concentración dada de ligando. Se puede definir como los moles de ligando unido por mol de proteína total. Es evidente que el valor de \bar{v} , que aumenta al aumentar $[L]$, puede oscilar entre 0 y n . El coeficiente de Hill, que varía también entre 0 y n , es una medida del grado de cooperatividad: cuanto más se aproxime a n mayor es la cooperatividad que presenta la unión de ligando a la proteína.

La ecuación [I] puede adaptarse fácilmente para aplicarla a las curvas de saturación de la hemoglobina. Basta tener en cuenta que, si se quiere evaluar la saturación de forma porcentual y en vez de concentración se utiliza la presión parcial de oxígeno, como se ha venido haciendo hasta ahora, la ecuación toma la forma:

$$S = \frac{100Kp^{c_H}}{1 + Kp^{c_H}} \quad \text{[II]}$$

donde S es el porcentaje de saturación y p la presión parcial de oxígeno.

Como se acaba de apuntar, el tratamiento de Hill no puede dar una explicación molecular de la cooperatividad de la hemoglobina —y mucho menos del efecto Bohr o de la inhibición causada por el 2,3-BPG—, sino solo cuantificarla. Los primeros intentos de justificar la cooperatividad, tal vez inspirados en la idea latente en una propuesta de Linus Pauling, intentaban dar una explicación *microscópica*, es decir, la cooperatividad se explicaría a nivel de *cada molécula concreta*, o sea, la unión de ligando a un sitio de *una molécula* conllevaría el aumento de la afinidad de los demás sitios de *esa misma molécula*. Evidentemente, aunque la naturaleza de las comunicaciones que pueden existir entre los diferentes sitios de unión de una moléculas se desconozca, parece a

simple vista lógico pensar que esa comunicación puede existir.

Habían de pasar muchos años, fecundos en la investigación sobre la estructura y propiedades de las proteínas, para que se empezaran a vislumbrar las posibles causas de la cooperatividad en la unión del oxígeno. En general, se puede hablar de cooperatividad en la unión de ligandos, ya que este comportamiento no es, ni mucho menos, exclusivo de la hemoglobina. A finales de la década de 1950 se descubrieron algunas enzimas que presentaban cooperatividad en la unión de sus sustratos y que, por tanto, en vez de presentar la clásica cinética de Michaelis-Menten, con sus típicas curvas hiperbólicas⁵, se obtenían curvas sigmoides al representar la velocidad inicial frente a la concentración de sustrato. Entre esas enzimas se encontraba la treonina desaminasa, que constituía el tema de la investigación predoctoral de Jean Pierre Changeux. Dos consagrados investigadores del Instituto Pasteur de París, Jacques Monod y François Jacob le habían propuesto al alimón en 1959 iniciar una tesis sobre la retroinhibición de la treonina desaminasa por isoleucina.

Monod y Jacob llevaban algún tiempo colaborando en el estudio de la regulación genética y llegaron a postular en 1961 el famoso modelo de regulación del operón *lac* de *Escherichia coli*, que les valdría la obtención del premio Nobel. Lo mismo que en el operón *lac* la proteína represora cambia su capacidad de interactuar con el DNA al unirse a una molécula no relacionada estructuralmente, la treonina desaminasa, que cataliza la primera etapa de la biosíntesis de isoleucina, pierde su capacidad de unir sustrato en presencia de ese producto final, que no está relacionado estructuralmente con la treonina. Changeux observó que la enzima, poseía varias subunidades y que por calentamiento ligero se hacía insensible a los efectos del inhibidor, isoleucina, pero no se modificaba su capacidad catalítica. Este fenómeno, que el propio Changeux comenzó a llamar desensibilización, parecía indicar que sustrato e inhibidor se unían a

⁴ En el tratamiento original de Hill, K sería la constante de afinidad para la un ligando que presentara cooperatividad infinita en su unión. La ecuación [I] corresponde a una reelaboración del tratamiento inicial, en el que K carece generalmente de sentido. A pesar de las deficiencias matemáticas, la ecuación se sigue utilizando en la actualidad para determinar el coeficiente de Hill.

⁵ La cinética de Michaelis-Menten se ha tratado en otro artículo de este programa, perteneciente al año 2005 (Franco, 2007).

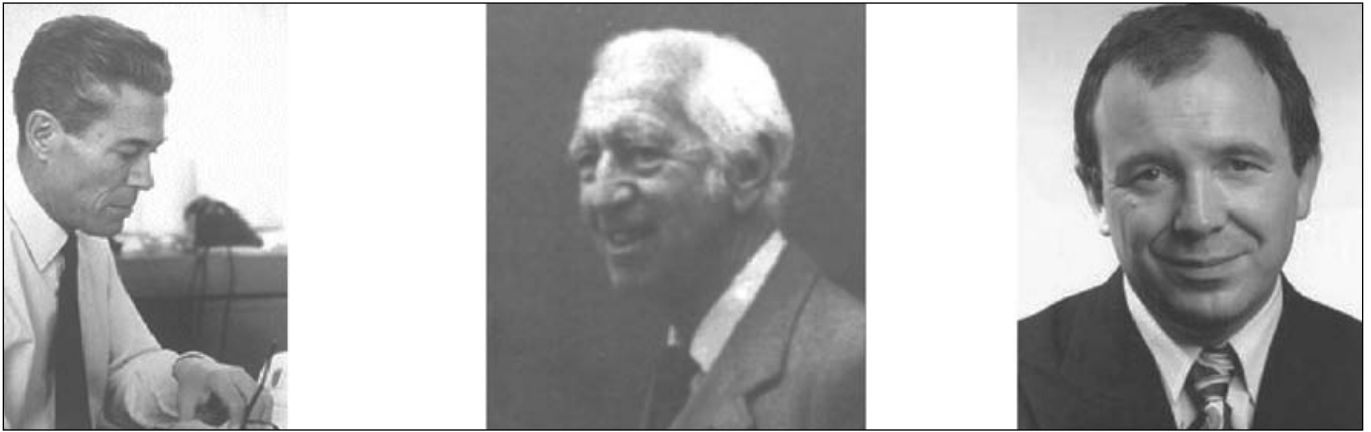


Figura 15. Jacques Monod, 1910-1976 (izquierda), Jeffries Wyman, 1901-1995 (centro) y Jean-Pierre Changeux, 1936- (derecha).

sitios diferentes en la enzima. Precisamente entonces, Monod acuñó el término *alosterismo*. Esta palabra de raíz griega significa precisamente eso: otro lugar.

Monod y Jacob (1961) por un lado y Changeux (1961) por otro, presentaron sus resultados en la edición de 1961 de los *Cold Spring Harbor Symposia*. Cuando el volumen que recogía sus intervenciones se publicó, la comunidad científica tuvo ocasión de leer por primera vez la palabra alosterismo, que Monod no había llegado a pronunciar en público. Monod, Changeux y Jacob (1963) definen el mecanismo alostérico con una condición negativa y con otra positiva. La primera niega la existencia de interacciones directas de cualquier género entre el sustrato o sustratos de una proteína alostérica y el efector, metabolito que controla su actividad. La segunda establece que el efecto alostérico se debe totalmente a una alteración conformacional reversible inducida en la proteína cuando se une el efector específico.

Cuando Monod, Changeux y Jacob (1963) establecieron estos conceptos, se conocían aún pocas enzimas cuyo comportamiento se pudiera definir como alostérico. En su artículo se detienen expresamente en 6, pero, además de las enzimas, añaden precisamente la hemoglobina —enzima honoraria, la llamarían más tarde—, cuyo comportamiento tanto tiene en común con la treonina desaminasa y el resto de las enzimas alostéricas: el estar formada por varias cadenas polipeptídicas, la cooperatividad en la unión del

ligando y la inhibición de esta unión por una molécula no relacionada, el 2,3-BPG.

El primer modelo que dio cuenta de un modo satisfactorio de las posibles causas moleculares de la cooperatividad y del alosterismo fue fruto de la intuición de Monod, que siguió contando con la participación de Changeux e inició una colaboración con Jeffries Wyman (Fig. 15). Era este investigador norteamericano, que trabajaba entonces en Roma, uno de los mejores conocedores de la hemoglobina, la *enzima alostérica honoraria*. El resultado del esfuerzo coordinado de los tres investigadores, fue una publicación en la que se proponía “un modelo plausible” para explicar la naturaleza de las transiciones alostéricas (Monod *et al.*, 1965). Con frecuencia se ha identificado ese modelo con las iniciales de sus tres autores: MWC.

Gran parte del artículo está dedicada a explicar la cooperatividad y sobre este extremo es preciso detenerse inicialmente. Postulan la existencia en esas proteínas, aun en ausencia de ligando, de dos estados conformacionales, T y R, que difieren en cuanto a afinidad por el ligando —mayor para las formas R—, y que pueden interconvertirse libremente. No admiten la existencia de estados intermedios, que posean propiedades estructurales híbridas entre T y R. Los n sitios de unión de ligando a las formas R son equivalentes e independientes⁶ entre sí, y otro tanto ocurre con los sitios de las formas T. Es obvio que, si no fuera

⁶ En el estudio de las interacciones proteína-ligando se habla de sitios equivalentes e independientes para referirse a aquellos cuya afinidad no varía con el grado de saturación que posea la proteína. En otras palabras, no existe cooperatividad.

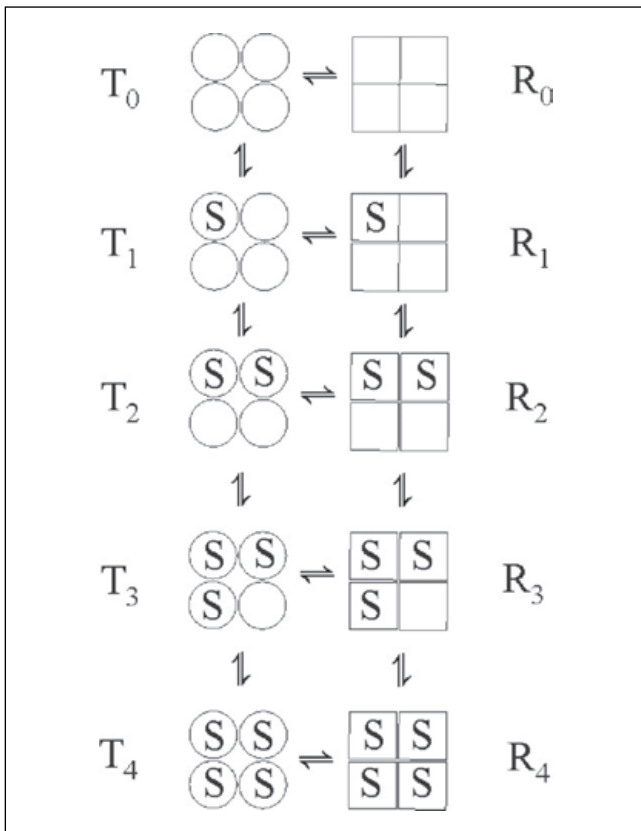


Figura 16. El modelo de Monod, Wyman y Changeux. En ausencia de ligando coexisten dos formas T y R. El ligando (S) se puede unir a ambas formas, con lo que todos los equilibrios que se muestran en la figura son posibles. No caben formas intermedias entre T y R. En todos los casos, el subíndice de T y R indica el número de sitios ocupados por ligando.

por la coexistencia de T y R, la unión de ligando transcurriría sin cooperatividad. Pero cuando se tienen en cuenta los presupuestos anteriores, es evidente que, al añadir ligando, éste se unirá *preferentemente* a las formas R, las de afinidad mayor. Una simple consideración de las leyes del equilibrio químico nos indica que la presencia de ligando conlleva un desplazamiento del equilibrio $T \rightleftharpoons R$ hacia estas últimas formas, lo que da lugar a un incremento global de la afinidad. La figura 16 muestra esquemáticamente el proceso de unión de ligando a una proteína que, como la hemoglobina, posea cuatro sitios, uno en cada cadena polipeptídica.

Es evidente que, a medida que avanza la unión del ligando, la población de formas R irá creciendo. Si inicialmente el equilibrio $T \rightleftharpoons R$ está muy desplazado hacia la izquierda, al irse uniendo ligando el desplazamiento progresivo hacia la derecha puede dar lugar a

que la proteína totalmente saturada por ligando se encuentre prácticamente toda en forma R. A medida que aumenta la proporción de formas R, su contribución a la unión de ligando se hará más y más importante y, puesto que estas formas son las de alta afinidad, es obvio que la constante de unión del ligando a la proteína irá aumentando progresivamente. La interpretación de la cooperatividad que implica el modelo de Monod, Wyman y Changeux es *macroscópica*, esto es, la cooperatividad existe a nivel del conjunto de las moléculas presentes en la disolución. Ciertamente, las propiedades de cada molécula concreta son decisivas, pero se ponen de manifiesto solo como consecuencia del comportamiento de la disolución. Se ha hecho anteriormente una referencia a las leyes de los equilibrios químicos y vale la pena recordar que la validez de estas leyes es macroscópica y no tienen por qué regir a nivel microscópico.

La figura 17 puede aclarar cuanto se viene diciendo sobre el carácter macroscópico del modelo MWC. En la situación concreta representada, que no tiene que ocurrir necesariamente, en ausencia de ligando son más abundantes las formas T. Eso hace que al añadir ligando, este se pueda unir en números absolutos a más formas T que R, pero la mayor afinidad de estas

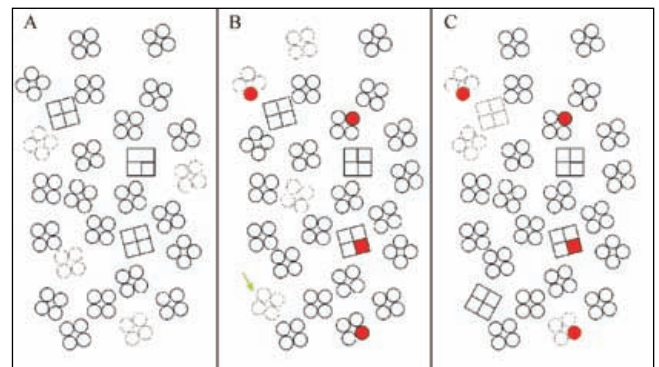


Figura 17. Esquema que muestra el carácter macroscópico del modelo MWC. (A) Una disolución de una proteína tetramérica, como la hemoglobina, en la que las formas T predominan sobre las R. (B) Al añadir ligando, se ocupan más sitios en las formas T por ser más abundantes, pero proporcionalmente la ocupación de sitios (simbolizada por el color rojo de la subunidad cargada con ligando) es superior en las formas R, de mayor afinidad. Este hecho distorsiona el equilibrio entre las formas T y R vacías. Para que el equilibrio se restablezca, alguna forma T (por ejemplo, la señalada con la flecha verde) ha de convertirse en R. (C) Situación de la disolución de proteína tras la conversión de una forma T en R. La proporción global de formas R ha aumentado y la unión del ligando que se añada posteriormente estará facilitada.

últimas hace que la proporción de formas R con ligando unido sea mayor que en el caso de T. Aunque los valores cuantitativos para el número de moléculas representado en la figura —pequeño en comparación con el que existe en una disolución aunque sea bastante diluida— no se puedan considerar absolutamente válidos, se ha procurado respetar esa unión proporcionalmente mayor de ligando a las formas R. Evidentemente, la relación entre formas R y T vacías habrá disminuido y las leyes del equilibrio hacen que, para que se mantenga la relación, la concentración de formas R no ocupadas por ligando deba aumentar. En otras palabras, algunas moléculas de forma T habrán de convertirse en R. Por ejemplo, la molécula señalada con una flecha en la figura 17B puede ser una de ellas, con lo que se llegaría a la situación esquematizada en la figura 17C⁷.

A pesar de la inicial extrañeza que puede causar el carácter macroscópico del modelo MWC, cuando se considera despacio puede deslumbrar su absoluta sencillez. Hay que señalar, no obstante, que esta misma sencillez ha pasado inadvertida a más de un autor, que se ha limitado a constatar que las ecuaciones derivadas de ese planteamiento conceptual se ajustan cuantitativamente bien al comportamiento experimental de algunas proteínas. En el artículo original (Monod *et al.*, 1965) los autores proponían la ecuación III para describir la unión cooperativa de un ligando a una proteína:

$$\bar{Y} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L(1+c\alpha)^n} \quad \text{[III]}$$

en la que \bar{Y} es el grado de saturación, es decir, la fracción molar de sitios ocupados por ligando, n es el número de sitios de unión de ligando por molécula de proteína, L la constante alostérica, definida como la constante del equilibrio entre las formas T y R en ausencia de ligandos⁸ y c es el cociente entre las con-

stantes de disociación para la interacción del ligando con las formas R y T, respectivamente. No es este el lugar adecuado para presentar una deducción de la ecuación III, pero el lector interesado puede acudir a la revisión de Tipton (1979), que es especialmente clara al respecto.

Los datos experimentales de unión de oxígeno a la hemoglobina se ajustan satisfactoriamente a la ecuación III; el mejor ajuste se logra para $L=9054$ y $c=0,014$.

Conviene hacer hincapié en que la resistencia inicial al modelo MWC se debía a su carácter macroscópico. Por eso algunos ni siquiera advirtieron la necesidad lógica de admitir el postulado de la conservación de simetría, es decir, la imposibilidad de encontrar formas híbridas entre T y R. La reacción no se hizo esperar y, poco después de la aparición del artículo de Monod, Wyman y Changeux, se publicó otro con el germen de lo que sería el segundo gran modelo alostérico (Koshland *et al.*, 1966). El artículo estaba firmado también por tres investigadores, Koshland, Némethy y Filmer, y también se conoce frecuentemente, de acuerdo con las iniciales de los autores, como el modelo KNF. En ese primer artículo, Koshland y sus colaboradores explicaban la cooperatividad con un modelo microscópico, según el cual todas las moléculas de la proteína se encuentran en la misma conformación en ausencia de ligando y la unión de este altera exclusivamente la conformación de la subunidad ocupada. La proteína va así cambiando secuencialmente de conformación. Esto puede afectar a la estabilidad de la estructura cuaternaria, si el cambio conformacional de cada subunidad altera su modo de interacción con las contiguas. Y como la estabilidad puede aumentar o disminuir, puede resultar cooperatividad positiva o negativa⁹. Los datos experimentales de la unión de oxígeno a la hemoglobina también se ajustan satisfactoriamente a las ecuaciones obtenidas por el modelo KNF (Koshland *et al.*, 1966).

⁷ Es preciso insistir en que con un número pequeño de moléculas como el utilizado para construir la figura 17, las leyes del equilibrio químico, que son válidas a nivel macroscópico, no tienen por qué cumplirse exactamente. No debe buscarse, pues, que la relación R/T se mantenga exactamente al comparar las figuras 17A y 17C; solo se pretende mostrar que el déficit de formas R en la figura 17B se compensa con la transición T→R que ocurre al pasar a la situación de la figura 17C.

⁸ Esta constante se define como T_0/R_0 , donde el subíndice 0 se refiere a la ausencia de ligandos.

⁹ En la cooperatividad negativa, que se presenta en algunas proteínas, la unión de ligando hace que disminuya la afinidad de los sitios desocupados.

Los años siguientes fueron fecundos, ya que la publicación del modelo KNF inició lo que Changeux (1993) llamó una “controversia creativa” entre las dos concepciones —macroscópica y microscópica— de la cooperatividad. Es evidente que no basta con que el ajuste de las curvas de saturación sea bueno. En definitiva, tanto la ecuación III como las del modelo KNF corresponden a cocientes de polinomios que, como es bien sabido, pueden adoptar las más variadas formas geométricas. Por ese motivo, los investigadores se lanzaron pronto a estudiar si, efectivamente, la conducta de la hemoglobina quedaba bien definida por el modelo MWC o se adaptaba mejor al KNF.

Evidentemente, si la hemoglobina se ajusta al modelo KNF, en ausencia de oxígeno todas las moléculas de la proteína se encontrarán en la misma conformación, mientras que si sigue el modelo MWC, en esas condiciones deben coexistir las formas T y R. Surge inmediatamente la pregunta: ¿podría detectarse experimentalmente esta coexistencia? Está claro que si la respuesta es positiva es posible inclinarse fácilmente por uno u otro de los modelos. Pero una consideración fácil permite contestar negativamente a la pregunta que se acaba de formular. Antes se ha comentado que el ajuste de los datos experimentales a la ecuación del modelo MWC se logra para $L=9054$, es decir, admitiendo que el proceso de unión siguiera el modelo MWC, en ausencia de oxígeno, aunque coexistirían las formas T y R, la proporción de las primeras sería casi 10 000 veces superior a la de las segundas; la abundancia de las formas R sería prácticamente despreciable, muy difícil de confirmar experimentalmente. Dicho con otras palabras, la estructura de la desoxihemoglobina debe corresponder prácticamente a la forma T, en el supuesto de que la hemoglobina siguiera el modelo MWC. Por el contrario, la estructura de la oxihemoglobina debería corresponder prácticamente a la de la forma R.

La cristalización de la hemoglobina en diversos estados de unión de ligandos permitió en la década de 1960 estudiar mediante difracción de rayos X la estructura terciaria y cuaternaria de la desoxihemoglobina y de la oxihemoglobina¹⁰, gracias fundamen-

talmente al trabajo del laboratorio de Max Perutz, que obtuvo en 1962 el premio Nobel de Química por sus investigaciones. Perutz asumió que la estructura obtenida para la desoxihemoglobina correspondía a la de la forma T de Monod, Wyman y Changeux, mientras que la de la oxihemoglobina se asimilaba a la de la forma R. En la comparación de ambas estructuras que se da a continuación, se sigue el trabajo de Perutz (1970), mientras no se diga lo contrario.

La principal diferencia entre la forma T y la R se da en la estructura cuaternaria. Si esta puede definirse como la unión de dos dímeros $\alpha\beta$, que, en lo sucesivo, se designan como $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_2$, la transición T→R se describe fundamentalmente como la rotación, de unos 12-15°, de un dímero sobre otro. En la figura 18 se aprecian las estructuras de las formas T (desoxihemoglobina) y R (oxihemoglobina). Se puede observar la rotación y la consiguiente variación de la amplitud del hueco central que existe en la molécula de hemoglobina. Describir el cambio conformacional como una rotación de un dímero con respecto al otro implica que, mientras los contactos $\alpha_1-\beta_1$ y $\alpha_2-\beta_2$ cambian poco como consecuencia de la transición T→R, los contactos $\alpha_1-\alpha_2$, $\beta_1-\beta_2$, $\alpha_1-\beta_2$ y $\alpha_2-\beta_1$, lo hacen de modo importante.

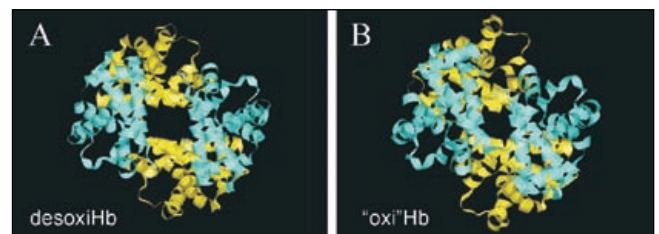


Figura 18. Estructura de las formas T y R de la hemoglobina humana. (A) Estructura de la desoxihemoglobina. Por las razones dadas en el texto, se asimila a la forma T. (B) Estructura de la “oxihemoglobina”. En realidad, la estructura se determinó experimentalmente a partir de un complejo hemoglobina-monóxido de carbono. Por las razones dadas en el texto, se asimila a la forma R. Las figuras están representadas a partir de los datos de Fermi *et al.* (1984) para la desoxihemoglobina y de Jenkins *et al.* (2009) para la oxihemoglobina mediante el programa RasMol. Las moléculas de hemoglobina se ven desde el eje binario de simetría, pero están giradas 40° en el sentido contrario a las agujas del reloj con respecto a la de la figura 2.

¹⁰ Estrictamente hablando, la estructura de la oxihemoglobina no se describió directamente, debido a las dificultades para cristalizarla. Se pudo cristalizar el complejo entre hemoglobina y monóxido de carbono y estudiar su estructura mediante difracción de rayos X. Al ser este compuesto un inhibidor competitivo de la unión de oxígeno, la estructura que resulta de su unión es idéntica a la de la oxihemoglobina.

A nivel de la estructura terciaria de las subunidades, los cambios son sutiles, aunque importantes. Los que tienen lugar en el entorno del grupo hemo se han descrito más arriba y se ha comentado que la unión de oxígeno implica un desplazamiento de 0,6 Å de la histidina proximal, que arrastra la hélice F y, en consecuencia, la región FG. En las cadenas β este cambio, aunque sea pequeño —no llega a 1 Å—, es de gran interés. Afecta a la posición de la histidina C-terminal, cuyo imidazol interacciona con el carboxilo lateral del aspartato FG1. A su vez, en la forma T, el carboxilo terminal de esa histidina establece interacciones iónicas con la cadena lateral de una lisina de la cadena α del otro dímero. Todo esto da lugar al cambio en los contactos α_1 - β_2 , que antes se ha mencionado, al pasar de la estructura T a la R (Perutz, 1990).

Pero las consideraciones estructurales que se acaban de hacer no solo explican a nivel molecular la naturaleza de las diferencias entre las formas T y R, sino que, en buena parte, sirven para explicar la causa del efecto Bohr. Se acaba de indicar que, en las formas T, la histidina C-terminal (HC3) de cada cadena β interacciona con el aspartato FG1 de la misma cadena. Pues bien, dado el valor del pK_a del imidazol de esas histidinas, próximo al pH fisiológico, una pequeña elevación del pH conlleva una importante disminución de la carga positiva de la cadena lateral, con el consiguiente debilitamiento de su interacción con el aspartato FG1. Como quiera que esta interacción es decisiva en el mantenimiento de los contactos α_1 - β_2 en la forma T, el resultado es que una elevación del pH desestabiliza la forma T. Esto explica en parte el efecto Bohr, ya que si, al elevar el pH, el equilibrio $T \rightleftharpoons R$ se desplaza hacia las formas R, al ser estas las de alta afinidad por el oxígeno, es lógico que la unión de este ligando se vea favorecida a pH más alcalino. Una explicación exhaustiva del efecto Bohr es, evidentemente mucho más compleja, pero estaría fuera de lugar en este artículo. El lector interesado puede consultar la excelente revisión de Perutz *et al.* (1998) o la más reciente de Giardina *et al.* (2004) para obtener más detalles.

En 1972, se describió, tras experimentos de difracción de rayos X, la estructura del complejo entre la hemoglobina y el 2,3-BPG (Arnone, 1972). En la proteína existe un único sitio de unión para el efector, que se encuentra exclusivamente en la forma T, pre-

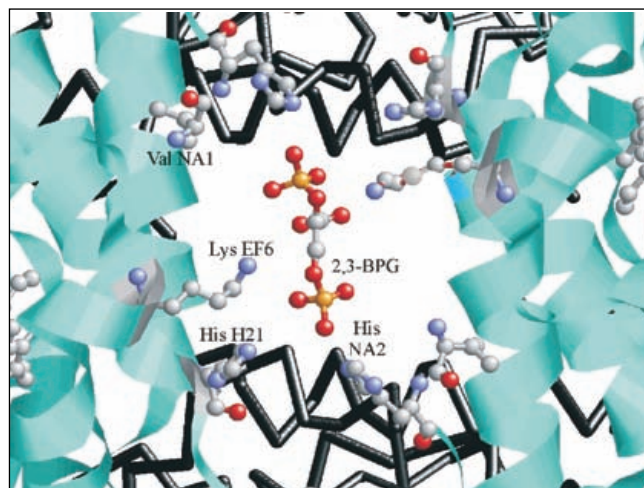


Figura 19. El sitio de unión del 2,3-BPG en la forma T de la hemoglobina. La molécula de hemoglobina se muestra en la misma orientación que en la figura 18. Las hélices de las cadenas β se muestran como cintas de color azul, mientras en las cadenas α , que no intervienen en la unión del 2,3-BPG, se muestra solo el esqueleto en negro. Se identifican, en una u otra de las cadenas β , los aminoácidos que interaccionan directamente con el 2,3-BPG. Estos aminoácidos, así como el efector, están representados en modo de bolas y varillas. Del mismo modo están los grupos hemo de ambas cadenas β , que pueden verse en parte a la derecha e izquierda de la figura.

cisamente en el hueco central que, como se ha visto en la figura 18, existe en la molécula lejos de los grupos hemo, lugares de unión del oxígeno. El sitio está flanqueado por los aminoácidos, así como por las hélices H NA1-NA3 de ambas cadenas β . En ese lugar, gracias a sus cargas negativas, el 2,3-BPG interacciona con el grupo amino terminal de la valina NA1 y con las cadenas laterales de His NA2, lisina EF6 e His H21 de cada cadena. El conjunto de estos puentes salinos entre las cargas negativas del 2,3-BPG y las positivas de los 8 aminoácidos implicados proporciona una gran estabilidad a la interacción. Como esta interacción hemoglobina-efector tiene lugar exclusivamente en la forma T de la proteína, la presencia del efector desplaza el equilibrio $T \rightleftharpoons R$ hacia la izquierda. Puesto que, según las hipótesis del modelo MWC, las formas T son las de baja afinidad por el oxígeno, está claro que un aumento en la concentración del efector conlleva la transición hacia una forma de baja afinidad por el oxígeno y, por tanto a la disociación de este ligando.

El conocimiento del modo de acción del 2,3-BPG permitió además solucionar el mecanismo de la transferencia de oxígeno de la madre al feto. La hemoglobina fetal, que se conoce como HbF en contra-

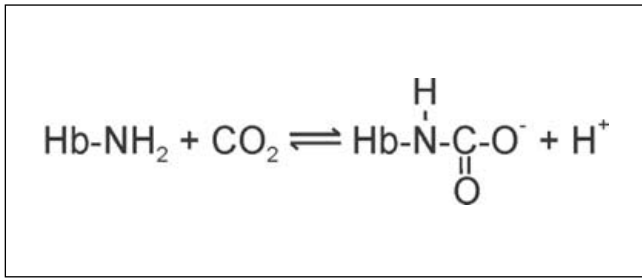


Figura 20. Reacción de la hemoglobina con CO₂. Se detalla la formación de carbamato entre el CO₂ y los aminoácidos N-terminales de las cadenas α.

posición a la del adulto, HbA, posee dos cadenas γ en sustitución de las cadenas β. La estructura de la HbF es prácticamente similar a la de la HbA, pero el aminoácido H21 de la cadena γ es una serina en vez de una histidina. Al ser neutra la cadena lateral de la serina, la carga positiva aportada por los aminoácidos del sitio de unión es menor y la interacción HbF-(2,3-BPG) resulta más débil que la que tiene lugar en el adulto. Una unión más débil del 2,3-BPG, al ser este un inhibidor, significa que la HbF tiene una capacidad de ligar oxígeno mayor que la HbA y, por tanto, puede pasar oxígeno de la sangre de la madre a la del feto.

Como se recoge en el esquema de la figura 3, el CO₂, además de producir bicarbonato que se disuelve en el plasma sanguíneo se transporta de vuelta a los pulmones unido a la hemoglobina. Esta unión tiene lugar mediante una reacción química, que al tener una energía de activación baja, ocurre sin necesidad de catálisis. Consiste en la formación de un anión carbamato al reaccionar con el grupo amino libre de la valina N-terminal (NA1) de las cadenas α (Figura 20). La reacción implica un ataque nucleofílico del grupo amino al CO₂ y, por tanto, requiere que el nitrógeno amínico posea su par de electrones libre. El pK_a de ese grupo amino es menor en la forma R que en la T y, por tanto, es más fácil encontrar desprotonado ese grupo en la forma T que en la R. Esto explica la preferencia del CO₂ para formar carbamato con la forma T. Este hecho, además, permite comprender que la unión del CO₂ a la hemoglobina es otro factor que permite una liberación extra de oxígeno: la preferencia por las formas T hace que la unión del CO₂, tanto mayor cuanto mayor sea la actividad metabólica de los tejidos, desplaza el equilibrio T⇌R hacia la izquierda, con la consiguiente pérdida de afinidad por el oxígeno. El desprendimiento de protones que tiene

lugar en la reacción (Figura 20), contribuye adicionalmente, a través del efecto Bohr, a una mayor liberación de oxígeno.

En este momento es posible completar el esquema de la figura 3 con unas explicaciones a nivel molecular que, además, sirven de resumen de cuanto se viene diciendo. La hemoglobina sale de los pulmones cargada totalmente de oxígeno y en su forma R. En los tejidos, la menor presión parcial de oxígeno, la mayor acidez (pH=7,2 en condiciones basales) y el desprendimiento de CO₂ hace que, en mayor o menor grado según los requerimientos, el oxígeno transportado se libere y la hemoglobina forme el anión carbamato. Como consecuencia de todo esto, el equilibrio conformacional se desplaza más o menos hacia la forma T y así retorna la hemoglobina a los pulmones. Al llegar a ellos, la elevada presión parcial de oxígeno, la baja proporción de CO₂ en el aire inspirado y el mayor pH (entre 7,4 y 7,5) hace que todos los procesos sigan un camino inverso: el carbamato revierte y se libera CO₂, la hemoglobina se vuelve a cargar de oxígeno y el equilibrio conformacional se desplaza de nuevo hacia la forma R.

En los párrafos precedentes queda patente la sencillez con que el modelo MWC, basándose solo en las leyes del equilibrio químico, puede dar cuenta de la cooperatividad en la unión de oxígeno a la hemoglobina, del efecto Bohr y de la inhibición causada por el 2,3-BPG. Quizá en este momento sea conveniente considerar algunos aspectos más a propósito del efecto de este inhibidor. En primer lugar, vale la pena advertir que el conjunto de los datos experimentales encaja perfectamente en el concepto de alosterismo, tal como fue postulado inicialmente por Monod *et al.* (1963). Por un lado, el efector se une a un lugar distinto que el ligando principal y, por tanto, la inhibición no se produce por competencia. En segundo lugar, la transmisión del efecto del inhibidor —lo que habitualmente se conoce como efectos heterotrópicos— tiene lugar a través de un cambio conformacional reversible, la transición R→T. Finalmente, hay que advertir que es posible generalizar el mecanismo de actuación del 2,3-BPG para que se pueda aplicar a otras proteínas alostéricas. Incluso es posible explicar de un modo análogo el efecto de los activadores alostéricos, aunque este no sea el caso de la hemoglobina. Monod y sus colaboradores proponen, en general, que los activadores

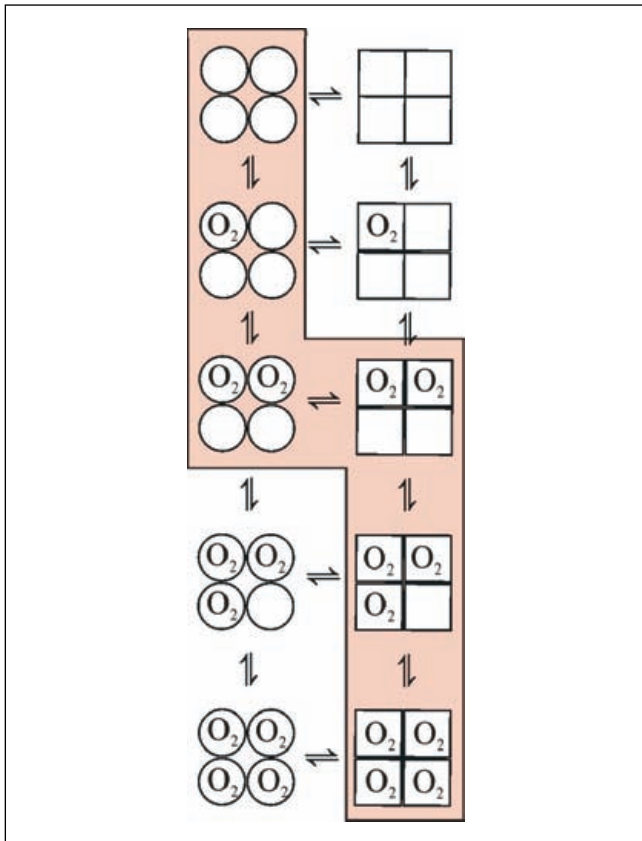


Figura 21. Un modo posible de saturación de la hemoglobina por la molécula de dioxígeno. Las 8 especies moleculares que se recogen en la figura son posibles, de acuerdo con el modelo MWC, pero las más abundantes son las que aparecen sobre fondo rosa, por lo que, a efectos prácticos, se puede asumir que el proceso de unión de dioxígeno sigue la ruta: $T_0 \rightarrow T_1 \rightarrow T_2 \rightarrow R_2 \rightarrow R_3 \rightarrow R_4$.

alostéricos se unen preferentemente a las formas R, mientras que los efectores negativos lo hacen a las formas T. En ambos casos, la unión es reversible y tiene la consecuencia de alterar, en un sentido u otro, el equilibrio alostérico. De este modo, los efectores actúan variando la afinidad de la proteína por el ligando principal, el sustrato si se trata de una enzima (Monod *et al.* 1965).

Como se ha comentado anteriormente, las ecuaciones del modelo KNF también permiten un buen ajuste de los datos experimentales de saturación de la hemoglobina (Koshland *et al.* 1966). La explicación del alosterismo, sin embargo, requiere una elaboración más sofisticada, que el propio Koshland hizo más tarde (Koshland, 1970) y no permite una interpretación unitaria del comportamiento de la hemoglobina, como se acaba de ver que hace el modelo MWC.

De todas formas, al ser simples y generalizadores, como ha de ocurrir con todos los modelos, es ocioso decir que ni la hemoglobina ni prácticamente ninguna otra proteína alostérica se puede definir al 100% por uno u otro de los modelos. Como consecuencia, han surgido modelos alternativos, modelos integradores, etc. Algunos de ellos, se han revisado recientemente (Ciaccio *et al.*, 2008) pero, en definitiva, cuando han transcurrido más de 45 años desde la propuesta del primer modelo alostérico, todos ellos se reducen de una forma u otra al MWC o al KNF. Algunas proteínas se adaptan más a uno o a otro, pero es forzoso reconocer que son más los sistemas cuyo mecanismo permite una explicación satisfactoria basándose en el modelo MWC, que los que pueden describirse por el modelo KNF.

Es preciso insistir en que el modelo MWC tiene el encanto especial de las ideas geniales, que en su aparente sencillez encierran un profundo significado. Tan es así, que el modelo se ha aplicado con éxito no sólo a la hemoglobina y a muchas enzimas alostéricas, sino que también ha servido para explicar el comportamiento de represores genéticos o de receptores (Changeux y Edelstein, 2001; Kardos y Nyikos, 2001), el plegamiento de las proteínas (Horovitz *et al.*, 2001; Luque *et al.*, 2002), la contracción muscular (Khaitlina, 2001), la regulación de la coagulación sanguínea (Eigenbrot y Kirchhofer, 2002), etc.

En el caso concreto de la hemoglobina, pronto se advirtió que algunos de los aspectos del mecanismo de unión de oxígeno no se explicaban totalmente por el modelo MWC. El valor de las constantes de los 4 equilibrios no se ajusta a los predichos por el tratamiento de ese modelo. Partiendo de esa consideración y teniendo en cuenta las diferencias en estructura terciaria de las subunidades entre la desoxi- y la oxihemoglobina (véase más arriba), el propio Perutz (1990) propuso una posible secuencia de acontecimientos que se esquematiza a continuación. La gran mayoría de las moléculas de hemoglobina, en ausencia de oxígeno, se encuentran en forma T. Aunque la unión de oxígeno sea preferente a las formas R, dada la abundancia de las formas T, mayoritariamente el oxígeno se unirá a estas formas. La unión a una cadena conlleva los cambios estructurales en el entorno del grupo hemo y las alteraciones de estructura terciaria que se han detallado antes. Estas alteraciones llegan a afectar los

dominios de unión con las subunidades vecinas, lo que va creando una cierta tensión en la molécula. Aunque esta siga en el estado T, al irse acumulando estas tensiones a medida que avanza la saturación, llega un momento en que *la totalidad de la molécula* pasa a la forma R. El proceso podría describirse, por ejemplo, por el esquema de la figura 21.

Hay que advertir que el rasgo fundamental del modelo MWC seguiría conservándose aunque la unión de oxígeno siguiera el esquema de la figura 21, toda vez que el cambio estructural seguiría siendo concertado. Es cierto que, en parte, la explicación macroscópica de la cooperatividad da paso, en cierto sentido, a una descripción microscópica, pero hay que tener en cuenta que en ese esquema solo se pretende señalar que las formas *más abundantes* son las que ocupan la zona sombreada. Al contemplar la presencia, aunque minoritaria, de las formas fuera de esa zona, se conservan también las propiedades macroscópicas del modelo.

Las investigaciones más recientes sobre la hemoglobina siguen reforzando la aplicabilidad del modelo MWC. En un estudio exhaustivo, se analizaron datos cinéticos muy precisos sobre la disociación de complejos hemoglobina-monóxido de carbono para concluir que el modelo de dos estados sirve para explicar satisfactoriamente la cooperatividad en la unión de ligandos a la hemoglobina (Henry *et al.*, 1997). Por supuesto, es necesario introducir precisiones matemáticas en las ecuaciones simples del tratamiento inicial, pero el rasgo fundamental del modelo, es decir, el que la transición entre dos estados conformacionales sea concertada, parece resistir los embates del tiempo.

A MODO DE CONCLUSIÓN

En las líneas precedentes se han presentado algunos rasgos fundamentales del comportamiento de la hemoglobina, que permiten descartar la posibilidad, apuntada al principio, de que la hemoglobina fuera *un fracaso de la naturaleza*. Realmente, aunque sea sólo para transportar cuatro moléculas de dioxígeno, parece evidentemente necesario ese aparente derroche de utilizar una molécula de una masa más de 500 veces superior. Sin las propiedades de la molécula de hemoglobina estudiadas en este artículo —cooperatividad,

efecto Bohr, inhibición alostérica por el 2,3-BPG, unión del CO₂— sería imposible la fina regulación que se requiere para un transporte que de cuenta de los requerimientos de cada tejido, de sus necesidades metabólicas, de la adaptación a la altura, etc. El lector habrá podido comprobar cómo la delicada arquitectura de la molécula de hemoglobina permite el desarrollo de todas esas funciones y, si ha *contemplado* con espíritu abierto sus propiedades, habrá llegado a asombrarse ante el exquisito comportamiento de esa *molécula prodigiosa*.

Pero hace falta una observación adicional. Toda persona interesada en las propiedades de la hemoglobina que haya leído este artículo, habrá observado una cierta diferencia con la presentación que se suele hacer del comportamiento de esa molécula en los libros de texto habituales. En efecto, en el presente artículo se han sacrificado muchos detalles particulares del mecanismo de la hemoglobina en aras de lograr una presentación unitaria, bajo la perspectiva del modelo de Monod, Wyman y Changeux. Como se ha advertido, el modelo supone una simplificación, pero, si se es consciente de ello, no se pierde rigor científico. Es más, puede ser preferible prescindir de detalles y de tratamientos cuantitativos —que aquí se han reducido al mínimo imprescindible— para lograr una visión de conjunto del comportamiento de la hemoglobina. Esa visión de conjunto puede servir como de cañamazo para que la persona interesada inserte después las precisiones y detalles necesarios para situar adecuadamente a la hemoglobina en el complejo mundo de la funcionalidad de las proteínas. Pero si, por el contrario, se hubiera incidido en los detalles, al faltar ese cañamazo, se podía caer en el extremo que condenaría el dicho popular de que *las ramas no dejan ver el bosque*. Mi intención ha sido mostrar el bosque. A los lectores que deseen saber más sobre la hemoglobina les resta ahora ir añadiendo las ramas.

BIBLIOGRAFÍA

1. ARNONE, A. (1972) X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature* **237**, 146-149.

2. BALDWIN, J. M. Y CLOTHIA, C. (1979) Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *J. Mol. Biol.* **129**, 183-191.
3. BENESCH, R. Y BENESCH, R. E. (1967) The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 162-167.
4. CHANGEUX, J. P. (1961) Feedback control mechanism of L-threonine deaminase by L-isoleucine. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 313-318.
5. CHANGEUX, J. P. (1993) Allosteric proteins: from regulatory enzymes to receptors —personal recollections. *BioEssays* **15**, 625-634.
6. CIACCIO, C., COLETTA, A., DE SANCTIS, G., MARINI, S., Y COLETTA, M. (2008) Cooperativity and allostery in haemoglobin function. *IUBMB Life* **60**, 112-123.
7. CHANGEUX, J. P. Y EDELSTEIN, S. J. (2001) Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 369-377.
8. CUI, Q. Y KARPLUS, M. (2008) Allostery and cooperativity revisited. *Prot. Sci.* **17**, 1295-1307.
9. EIGENBROT, C. Y KIRCHHOFER, D. (2002) New insight into how tissue factor allosterically regulates factor VIIa. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 19-26.
10. FERMI, G., PERUTZ, M. F., SHAANAN, B. Y FOURME, R. (1984) The crystal structure of human deoxyhaemoglobin at 1.74 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **175**, 159-174.
11. FRANCO, L. (2007) Enzimas: qué son y para que sirven. *Rev. Real Acad. Cienc.* **101**, 399-417.
12. GIARDINA, B., MOSCA, D. Y DE ROSA, M. C. (2004) The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. *Acta Physiol. Scand.* **182**, 229-244.
13. HENRY, E. R., JONES, C. M., HOFRICHTER, J. Y EATON, W. A. (1997) Can a two-state MWC allosteric model explain hemoglobin kinetics? *Biochemistry* **36**, 6511-6528.
14. HOROVITZ, A., FRIDMANN, Y., KAFRI, G. Y YIFRACH, O. (2001) Allostery in chaperonins. *J. Struct. Biol.* **135**, 104-114.
15. JENKINS, J. D., MUSAYEV, F. N., DANSO-DANQUAH, R., ABRAHAM, D. J. Y SAFO, M. K. (2009) Structure of relaxed-state human hemoglobin: insight into ligand uptake, transport and release. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **65**, 41-48.
16. KARDOS, J. Y NYIKOS, L. (2001) Universality of receptor channel responses. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 642-645.
17. KHAITLINA, S. Y. (2001) Functional specificity of actin isoforms. *Int. Rev. Cytol.* **202**, 35-98.
18. KONDRASHOV, D. A., ZHANG, W., ARANDA, R., STEC, B., PHILLIPS, G. N. (2008) Sampling of the native conformational ensemble of myoglobin via structures in different crystalline environments. *Proteins* **70**, 353-362.
19. KOSHLAND, D. E. (1970) The molecular basis for enzyme regulation, en *The Enzymes*, vol I (Ed. Boyer, P. D.), pp. 341-396. Academic Press, New York.
20. KOSHLAND, D., NÉMETHY, G. Y FILMER, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* **5**, 365-385.
21. LUQUE I., LEAVITT S. A. Y FREIRE, E. (2002) The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 235-256.
22. MONOD, J., CHANGEUX, J. P. Y JACOB, F. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* **6**, 306-329.
23. MONOD, J. Y JACOB, F. (1961) Teleonomic mechanism in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 389.
24. MONOD, J., WYMAN, J. Y CHANGEUX, J. P. (1965) On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.
25. PERUTZ, M. F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* **228**, 726-739.
26. PERUTZ, M. F. (1990) *Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins*. 98 pp. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
27. PERUTZ, M. F., WILKINSON, A. J., PAOLI, M. Y DODSON, G. G. (1998) The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 1-34.
28. TIPTON, K. F. (1979) Kinetic properties of allosteric and cooperative enzymes, en *Companion to Biochemistry*, vol. II (Eds. Bull, A. T., Lagnado, J. R., Thomas, J. O. y Tipton, K. F.), pp. 327-382. Longman, London.
29. WATSON, H. C. Y KENDREW, J. C. (1961) Comparison between the amino-acid sequences of sperm whale myoglobin and human haemoglobin. *Nature* **218**, 1116-1119.