

Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador

Oscar Andrés Peñuela, M.D.*

RESUMEN

Se presenta la revisión general sobre la hemoglobina, una de las proteínas más estudiadas y mejor caracterizadas. La gran variedad de aspectos científicos que incluye y la importancia que juega en la biología hace que, aunque los primeros estudios científicos se hayan realizado desde el siglo XIX, aún hoy aparezcan sorprendentes descubrimientos acerca de esta molécula, tales como las nuevas globinas, neuroglobina y citoglobina y las llamativas interacciones con el óxido nítrico. Asimismo, el estudio de las hemoglobinopatías constituye un gran reto para la medicina moderna en la medida en que ponga al servicio de sus pacientes los resultados de la investigación científica básica.

Palabras clave: Hemoglobina; Transporte de gases; Evolución; Óxido nítrico.

Hemoglobin: a model molecule for research

SUMMARY

This paper has the objective to review hemoglobin, one of the most studied and characterized proteins. Hemoglobin is a very important protein in biology. Although the first papers were written in 19th century, today a lot of amazing discoveries are shown, like new globins neuroglobin and cytoglobin and, nitric oxide interactions. In addition, hemoglobinopathies are a medicine's challenge for applying basic research to the patient's attendance.

Key words: Hemoglobin; Blood gas transportation; Evolution; Nitric oxide.

Uno de los ejemplos más llamativos de la relevancia del proceso evolutivo y la eficiencia de los sistemas biológicos se encuentra en los eritrocitos. Una de sus funciones vitales es su participación en el intercambio gaseoso de oxígeno y dióxido de carbono entre los pulmones y los tejidos. La hemoglobina (Hb), es el componente fundamental de este proceso¹.

Las hemoglobinas son proteínas globulares, presentes en los hematíes en altas concentraciones, que fijan oxígeno en los pulmones y lo transportan por la sangre hacia los tejidos y células que rodean el lecho capilar del sistema vascular. Al volver a los pulmones, desde la red de capilares, la hemoglobina actúa como transportador de CO₂ y de protones².

La hemoglobina ha jugado un papel histórico en la química, la biología y la medicina. En 1849 se convirtió en la primera proteína en ser cristalizada y asociada con una función fisiológica específica. La diferencia morfológica entre los cristales de hemoglobina de diferentes organismos proporcionó por primera vez evidencia contundente acerca de la especificidad en la expresión proteica entre las especies. Además, se encuentra entre las primeras proteínas cuyo peso molecular

fue determinado correctamente. En 1958 se convirtió en la primera proteína eucariota en ser sintetizada *in vitro*, trabajo que permitió comprobar que el mecanismo de síntesis proteica en eucariotas es similar al de *Escherichia coli*. Su estructura se estableció en 1960³. El ARN mensajero de la globina fue el primer mensajero eucariota en ser aislado⁴ y en tener una secuencia nucleótida determinada⁵.

El descubrimiento de que la anemia de células falciformes es causada por el reemplazo de uno sólo de los 287 residuos de aminoácidos, presentó por primera vez indicios de que una mutación puntual en un gen estructural puede causar la sustitución de un aminoácido en la proteína codificada por este gen y causar enfermedad⁶. De otro lado, el estudio de la hemoglobina abrió campo al desarrollo de nuevos y sofisticados métodos físicos y el establecimiento de importantes teorías sobre cooperatividad y alosterismo⁷. De igual forma, la transición de la síntesis de hemoglobina desde la vida fetal a la adulta es un gran ejemplo de diferenciación celular⁸.

El estudio de las hemoglobinas anormales ha permitido claramente conocer la estrecha relación entre los errores genéticos, los defectos proteicos y las manifestaciones clíni-

* Estudiante Maestría en Fisiología, División de Fisiología, División de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. e-mail: oapenuelab@unal.edu.co

Recibido para publicación agosto 3, 2004 Aprobado para publicación junio 27, 2005

cas que produce. Finalmente, la distribución de ciertas hemoglobinas anormales como la HbS en regiones específicas endémicas de malaria, ilustra claramente los mecanismos naturales de la evolución y adaptación antropológica (polimorfismo balanceado).

GENÉTICA Y SÍNTESIS DE HEMOGLOBINA

La biosíntesis de la Hb guarda estrecha relación con la eritropoyesis. La expresión genética y el contenido de Hb acompañan la diferenciación de las unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E) en precursores eritroides. Cada una de las cadenas polipeptídicas de la Hb cuenta con genes propios: α , β , δ , γ , ϵ . Los genes α y β son independientes y se ubican en cromosomas distintos. El grupo α se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 y contiene además los codificadores de la cadena α . El grupo β se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 e incluye a los genes de las cadenas γ , δ y ϵ . Todos los genes funcionales de la globina comparten una estructura general que consiste en 3 exones (secuencias codificadoras) y 2 intrones o sectores interpuestos (secuencias que no se traducen). La región promotora incluye alrededor de 100 pares de bases que preceden al punto de comienzo de la transcripción (punto de clivaje). Tres secuencias de esta región se fijan a la ARN polimerasa que cataliza la síntesis de ARN mensajero. Existen dos secuencias claves en la iniciación de la transcripción: TATA y CAT; las mutaciones que las afectan limitan la transcripción de ARNm. La porción distal del tercer exón (AATAAA) finaliza la transcripción. Solamente entre 5% a 10% del material genético de los eritroblastos se transcribe; los genes de la globina pertenecen a esta fracción¹.

La síntesis de ARN se lleva a cabo bajo la influencia de grupos enzimáticos denominados ARN polimerasas. La transcripción primaria del ARNm incluye copias de toda la secuencia del ADN genómico (intrones y exones). Antes de su transporte al citoplasma se procesa por clivaje del extremo 5', hay separación de las secuencias transcritas de los intrones y poliadenilación del extremo 3'. Este último paso es esencial en el transporte y estabilización citoplasmática del ARNm. La separación implica la formación de asas en el pre-ARNm, de manera que los extremos distales de los exones (puntos dadores) se acerquen a los proximales de los subsiguientes exones (puntos receptores). Luego, los intrones sufren clivaje enzimático y los puntos dadores y receptores se sellan. Los puntos de consenso son secuencias de nucleótidos adyacentes que perfeccionan la síntesis del ARNm. Las

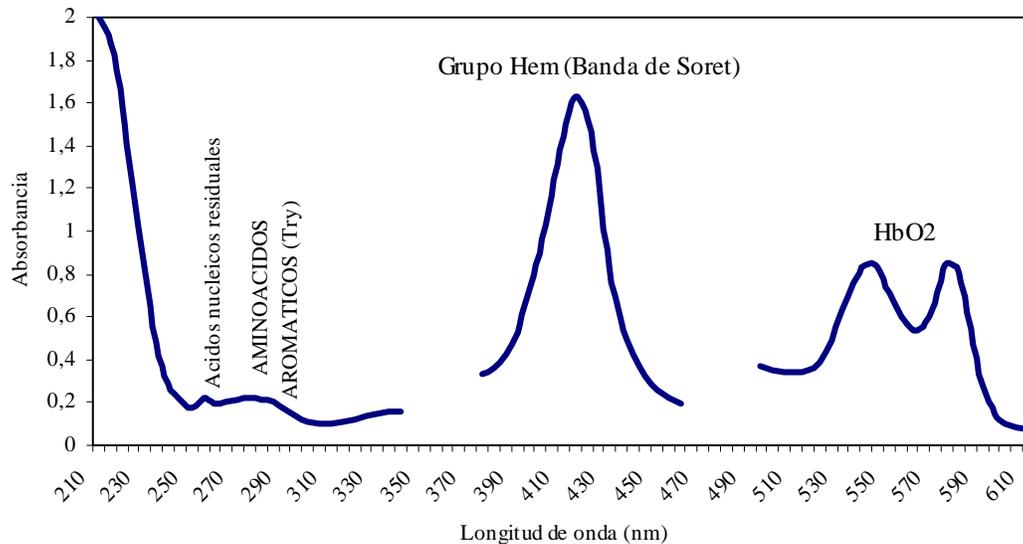
mutaciones que involucran tanto los puntos de unión, así como los de consenso, alteran la separación y crean ARNm anormales.

La causa más común de las hemoglobinopatías es la mutación puntual, es decir, la sustitución de un nucleótido de ADN por otro, lo que modifica el código genético y puede inducir un cambio en un aminoácido de la globina resultante. Por ejemplo, la anemia de células falciformes (HbS), donde el ácido glutámico se reemplaza por una valina en el aminoácido 6, que ocupa el tercer lugar del helicoide A de la cadena β : β_6 (A3) Glu \rightarrow Val¹.

La traducción es un proceso ribosómico en donde se sintetiza una cadena polipeptídica de acuerdo con un patrón proporcionado por la secuencia de codones del ARNm. Incluye cuatro etapas: activación, en la que se forma el ARN de transferencia (ARNt); iniciación, cuando el ARNt que contiene metionina, se alinea con el codón iniciador AUG en el ARNm del ribosoma; elongación, donde cada anticodón del ARNt se adosa a cada codón del ARNm. Los aminoácidos del ARNt se adosan mediante un puente peptídico a otro aminoácido ya unido al ribosoma. Finalmente, la terminación se produce cuando se llega a un codón de finalización UAA, la cadena polipeptídica se completa y se separa del ribosoma. Los polipéptidos libres forman de inmediato dímeros $\alpha\beta$ y tetrameros $\alpha_2\beta_2$.

La maduración de proeritroblastos a eritrocitos está controlada positivamente por la hormona polipeptídica eritropoyetina, que promueve tanto la proliferación como la sobrevivencia de los precursores eritroides. También, sobre la superficie de dichos precursores, se encuentran unos receptores que promueven la apoptosis y que son estimulados por enzimas denominadas caspasas. La activación de estos receptores (o la privación de eritropoyetina) conduce al clivaje, por parte de las caspasas, de una proteína reguladora nuclear llamada GATA-1, indispensable para el proceso eritropoyético, lo que conduce a apoptosis y detención de la maduración. Los receptores de «muerte celular» se han denominado sistema Fas/FasL¹⁰.

La constante investigación acerca de los genes sobre los cuales actúa el factor de transcripción genético GATA-1 condujo al descubrimiento de un gen expresado en altos niveles en el eritroblasto, que codifica una proteína chaperona denominada AHSP (proteína estabilizante de cadena alfa) la cual se une específicamente a las cadenas α , y cuyo papel está relacionado con la estabilización de dichas cadenas, evitando que se precipiten formando inclusiones citoplasmáticas (cuerpos de Heinz) que afectan a la membrana



Gráfica 1. Caracterización espectrofotométrica de la Hb

celular y conducen a la lisis eritrocitaria¹¹.

El grupo hem se sintetiza en virtualmente todos los tejidos, pero su síntesis es más pronunciada en la médula ósea y el hígado, debido a la necesidad de incorporarlo en la Hb y los citocromos, respectivamente. Es una molécula plana que consta de un hierro ferroso y un anillo tetrapirrólico, la protoporfirina IX. Característicamente demuestra una banda a 440 nm o de Soret y otras cuatro más en el espectro visible (Gráfica 1). El hem es un factor fundamental en la regulación de la tasa de síntesis de la globina¹². Su principal efecto se ejerce en la iniciación de la traducción, donde bloquea la acción de un inhibidor de la producción de globina¹³. También participa en la transcripción y el procesamiento del ARNm. Su papel en la síntesis proteica en los mamíferos se extiende más allá del eritrocito; en el tejido hepático y cerebral se demuestran sustancias que dependen del hem para comenzar la producción de proteínas¹⁴.

Normalmente los eritrocitos envejecidos se degradan hacia el día 120 de vida en la médula ósea, el hígado y el bazo. En algunas circunstancias sin embargo, los eritrocitos sufren lisis intravascular, liberando Hb, que puede ser tóxica para los tejidos a menos que se remueva rápidamente. La haptoglobina (Hp) es una proteína plasmática que une Hb libre, a través de la formación de un complejo Hp-Hb. Este complejo es reconocido a través de una proteína situada en la superficie de los macrófagos y monocitos denominada CD163, permitiendo su digestión y la seguida liberación de hierro y bilirrubina. La expresión de Hp y CD163 está regulada por proteínas de fase aguda como la interleucina 6 (IL-6) sugiriendo que las

enfermedades inflamatorias crónicas se relacionan con alteraciones del metabolismo del hierro¹⁵.

ESTRUCTURA DE LA Hb

Las cuatro cadenas polipeptídicas de la Hb contienen cada una un grupo prostético hem. Un grupo prostético es la porción no polipeptídica de una proteína. El hem es una molécula de porfirina que contiene un átomo de hierro en su centro. El tipo de porfirina de la Hb es la protoporfirina IX; contiene dos grupos ácidos propiónicos, dos vinilos y cuatro metilos como cadenas laterales unidas a los anillos pirrólicos de la estructura de la porfirina. El átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación ferroso (+2) y puede formar cinco o seis enlaces de coordinación dependiendo de la unión del O₂ (u otro ligando) a la Hb (oxiHb, desoxiHb). Cuatro de estos enlaces se producen con los nitrógenos pirrólicos de la porfirina en un plano horizontal. El quinto enlace de coordinación se realiza con el nitrógeno del imidazol de una histidina denominada histidina proximal. Finalmente, el sexto enlace del átomo ferroso es con el O₂, que además está unido a un segundo imidazol de una histidina denominada histidina distal. Tanto el quinto como el sexto enlace se encuentran en un plano perpendicular al plano del anillo de porfirina (Figura 1).

Las cadenas polipeptídicas a contienen 141 aminoácidos, las no α 146 (β , γ , δ) y difieren en la secuencia de aminoácidos. Se conoce desde hace décadas la estructura primaria de las cuatro cadenas de Hb normales¹⁶. La estructura secundaria es muy similar: cada una exhibe 8 segmentos helicoidales

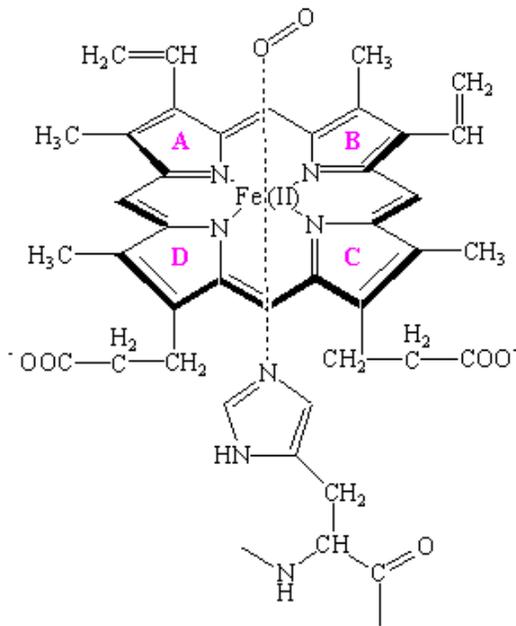


Figura 1. Estructura del grupo hem

designados con las letras A a la H. Entre ellos se encuentran 7 segmentos no helicoidales: NA, AB, CD, EF, FG, GH Y HC. Esta distinción es fundamental pues los segmentos helicoides son rígidos y lineales, mientras que los no helicoidales son flexibles. Como el hierro del hem forma un puente covalente con la histidina proximal (F8) y el O₂ se une de forma covalente al hem y a la histidina distal (E7), el hem queda suspendido en una hendidura no polar entre los helicoides E y F (Figura 2).

La difracción de rayos X de alta resolución permitió conocer la naturaleza de los contactos intercatenarios de la

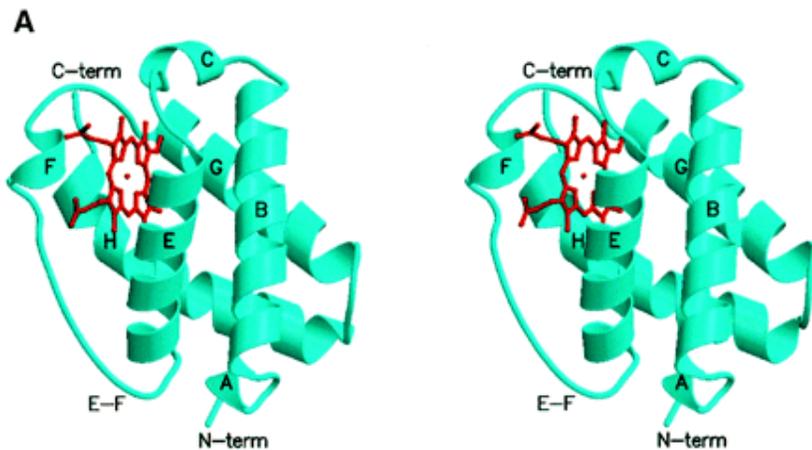


Figura 2. Estructura tridimensional de la hemoglobina

Hb. Los que se establecen entre cadenas semejantes, es decir, $\alpha 1\alpha 2$ y $\beta 1\beta 2$ son limitados y de escasa importancia. Los principales contactos son $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 1\beta 2$ que determinan dos estructuras cuaternarias: una para la oxiHb y otra para la desoxiHb¹⁷.

La parte porfirínica del hem se sitúa dentro de una bolsa hidrofóbica que se forma en cada una de las cadenas polipeptídicas. Las estructuras obtenidas por difracción de rayos X muestran que en la bolsa del hem existen unas 80 interacciones entre 18 aminoácidos y el hem. La mayoría de estas interacciones no covalentes se presentan entre cadenas apolares de aminoácidos y las regiones no polares de la porfirina.

TRANSPORTE DE O₂ Y CO₂

La sangre necesita de un transportador de O₂ porque este gas no es suficientemente soluble en el plasma sanguíneo para satisfacer las necesidades corporales. A 37°C, un litro de sangre sólo disuelve 2.3 ml de O₂. Sin embargo, un litro de sangre contiene 150 g de Hb, y como cada gramo de Hb disuelve 1.34 ml de O₂, en total se transportan 200 ml de O₂ por litro de sangre. Esto es, 87 veces más de lo que el plasma solo podría transportar. Sin un transportador de O₂ como la Hb, la sangre tendría que circular 87 veces más rápido, lo que precisaría una bomba de alta presión, un flujo turbulento y un enorme desacople ventilación-perfusión.

La relación entre la tensión de O₂ y la saturación de la Hb se describe mediante la curva de saturación de la oxiHb. La afinidad de la Hb por el O₂ se expresa en términos de la tensión de O₂ en que se produce una saturación de 50% de la Hb (P₅₀). Este valor corresponde a 27 mm Hg aproximadamente. De forma parecida a las enzimas, una P₅₀ alta corresponde a una afinidad por el O₂ baja.

La curva de disociación de la oxiHb de los polipéptidos con una sola unidad hem, como la mioglobina es hiperbólica. Así, su afinidad por el O₂ es mayor que la de la Hb, liberando O₂ solamente a muy bajas tensiones tisulares. Por el contrario, la curva de disociación de la hemoglobina es sigmoidea. De esta forma, la Hb está saturada 98% en los pulmones y sólo 33% en los tejidos, de manera que cede casi 70% de todo el O₂ que puede transportar. La porción más empinada de la curva se encuentra en las zonas de baja tensión de O₂ de los tejidos,

lo que significa que disminuciones relativamente pequeñas en la tensión de O_2 dan lugar a grandes incrementos en la cesión de O_2 . Sin embargo, pequeñas disminuciones en la tensión de O_2 en los pulmones (altitud moderada) no comprometen seriamente la capacidad de la Hb para fijar O_2 . Adicionalmente, la curva revela que a bajas tensiones de O_2 , la fijación de O_2 es relativamente débil (menor afinidad), mientras que a altas tensiones la fijación es fuerte (mayor afinidad). Lo anterior refleja el mecanismo de cooperatividad de la Hb, por el cual la ligadura del O_2 a una subunidad eleva la afinidad de las otras subunidades¹⁸.

La afinidad de la Hb por el O_2 está influida por una serie de variables que incluyen la concentración de protones, el CO_2 , la temperatura y el 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG)¹⁹. La concentración del ión hidrógeno influye sobre la afinidad de la Hb por el O_2 . El pH bajo desplaza la curva hacia la derecha, facilitando la cesión de O_2 , mientras que el pH elevado la desplaza hacia la izquierda. Esta modificación se conoce como efecto Bohr y se representa por la ecuación:



y demuestra que la oxigenación de la Hb aumenta la acidez, o dicho de otra manera, la desoxigenación de la Hb aumenta la basicidad.

La temperatura tiene también un efecto importante sobre la afinidad de la Hb por el O_2 . A temperaturas por debajo de la normal, la fijación es más fuerte, desplazando la curva a la izquierda; a temperaturas elevadas la fijación se hace débil y la curva se desplaza a la derecha.

La hemoglobina muestra además un efecto heterotrópico de gran significación biológica. Esto implica su interacción con el 2,3-DPG, el compuesto fosforilado predominante en el eritrocito²⁰. El 2,3-DPG funciona como un efector alostérico para la Hb. En la conformación desoxi (estructura cuaternaria *T*, «tensa») existe una cavidad suficientemente grande para admitir al 2,3-DPG entre las cadenas β . Además, esta cavidad está cargada positivamente, fijando así una molécula de 2,3-DPG de carga negativa. Cuando la Hb se oxigena, asume una configuración cuaternaria *R*, «relajada». Los fenómenos moleculares de este cambio no se han establecido totalmente, pero al parecer implica una configuración intermedia entre *R* y *T*. La conversión final a *R* se inicia con la fijación de una molécula de O_2 a la interacción $\alpha 1\beta 2$ y se continúa con la eliminación del 2,3-DPG y la disrupción de los puentes salinos e interacciones hidrófobas en el contacto $\alpha 1\beta 2$ formados en *T*²¹. Las variaciones de la concentración

del 2,3-DPG desempeñan un papel fundamental en la adaptación a la hipoxia, de manera que en la hipoxemia aumenta el 2,3-DPG eritrocitario, la afinidad por el oxígeno declina y el aporte a los tejidos se facilita²².

El transporte eritrocitario de CO_2 , a diferencia del transporte de O_2 , no se realiza por unión directa al hem, sino que se relaciona estrechamente con el mantenimiento del pH sanguíneo. El CO_2 difunde libremente en los eritrocitos, donde la anhidrasa carbónica cataliza la reacción



La posterior ionización del H_2CO_3 en H^+ y HCO_3^- es una reacción rápida y espontánea que genera cantidades equivalentes de H^+ y de HCO_3^- . El H^+ generado se incorpora a la desoxiHb, proceso facilitado por el efecto Bohr. El bicarbonato por su parte, difunde a través de la membrana eritrocitaria y en parte se intercambia con iones Cl^- del plasma, mecanismo denominado desplazamiento del cloruro. Así se transporta la mayoría del CO_2 . El restante, se transporta como CO_2 disuelto (5%) y como carbaminohemoglobina (15%), producto de la reacción del CO_2 con los grupos amino de la Hb, donde se generan entre 1 y 2 equivalentes de H^+ . La desoxiHb forma compuestos carbamino más rápido que la oxihb; la oxigenación produce liberación del CO_2 fijado. La curva de disociación del CO_2 es más lineal que la del O_2 , sobre todo en el rango fisiológico 40-60 mm Hg. La desoxiHb tiene mayor afinidad por el CO_2 a causa del efecto Bohr. El desplazamiento de la curva (efecto Haldane) favorece la fijación de CO_2 en los tejidos y su liberación en los pulmones.

La Hb además de transportar O_2 y CO_2 , juega también un papel fundamental en la regulación del pH sanguíneo. Esto se realiza por medio de dos mecanismos. El primero se debe a los grupos ionizables de la Hb (imidazoles de las 38 histidinas por tetrámero), que junto con los fosfatos orgánicos de los eritrocitos y las proteínas plasmáticas suman 60% del amortiguamiento sanguíneo. El resto del ácido que se produce a partir del transporte de CO_2 (40%) es absorbido por la Hb a través del transporte isohídrico de CO_2 , que corresponde al segundo mecanismo y se basa en la capacidad de la Hb para captar H^+ sin cambio en el pH.

HEMOGLOBINA NORMAL Y SUS VARIANTES

Para operar como vehículo de intercambio gaseoso, la hemoglobina (Hb) debe satisfacer ciertos requerimientos básicos como son: ser capaz de transportar cantidades

considerables de oxígeno; ser muy soluble; captar y descartar oxígeno a presiones apropiadas y, ser un buen amortiguador. Más del 95% de la hemoglobina del adulto y de los niños mayores de 7 meses es A (HbA). Su estructura se designa como $\alpha_2\beta_2$, para indicar que posee dos cadenas α y dos β . Los adultos normales también tienen un 2-3% de HbA₂, la cual está compuesta por dos cadenas α como las de la HbA, y dos cadenas δ . Se representa como $\alpha_2\delta_2$. Las cadenas δ son diferentes de las cadenas β y están bajo control genético independiente. Normalmente también existen diversas especies de HbA modificada; se designan como A1a1, A1a2, A1b y A1c, y se deben a modificaciones postraduccionales de la Hb con diversos azúcares como glucosa-6-fosfato. La más importante cuantitativamente es la Hb A1c. Proviene de la fijación covalente de un resto de la glucosa al extremo N-terminal de la cadena β . La reacción no es catalizada enzimáticamente, dependiendo entonces su velocidad de la concentración de glucosa. Por tanto, la Hb A1c constituye una medida útil del control de los pacientes diabéticos durante los días o semanas previos a la toma de la muestra.

La Hb fetal (HbF), es el componente principal de la Hb del recién nacido. Posee dos cadenas γ en lugar de dos cadenas β y se representa $\alpha_2\gamma_2$. La HbF está adaptada al ambiente materno-fetal. Ha de fijar el oxígeno mucho más fuerte para competir por el O₂ con la HbA materna (su curva de saturación está desplazada a la izquierda). Esto se consigue gracias a que dos de los grupos que recubren la cavidad de fijación de 2,3-difosfoglicerato (DPG) tienen cadenas laterales neutras, a diferencia de la HbA en la que están cargadas positivamente. Lo anterior hace que el DPG, cargado negativamente, se una menos a la HbF y en lugar de ello, se fije más fuerte el O₂. Además, entre 15% y 20% de la HbF está acetilada en sus N-terminales y se denomina HbF1; esta variante no fija DPG¹ (Cuadro 1).

Las hemoglobinas Gower I, Gower II y Portland son embrionarias y sólo aparecen durante el primer trimestre de gestación²⁴. La Hb Gower II es la más importante y alcanza entre 50% y 60% de toda la Hb embrionaria. Al parecer las cadenas polipeptídicas epsilon (ϵ) y zeta (ζ) se sintetizan en el saco vitelino. Las cadenas β , ϵ , γ , δ están codificadas por un gen del cromosoma 11; las ζ y α por un gen del extremo 5' del cromosoma 16.

EVOLUCIÓN NATURAL

Las hemoglobinas están presentes en todos los reinos de la naturaleza con particulares especializaciones de acuerdo

Cuadro 1
Hemoglobinas humanas

Nominación	Composición	Proporción	
		adultos (%)	neonatos (%)
HbA	$\alpha_2\beta_2$	97	20
HbA ₂	$\alpha_2\delta_2$	2.5	0.5
HbF	$\alpha_2\gamma_2$	<1	80

con las necesidades de cada organismo. Se pueden sintetizar grandes cantidades de hemoglobina en células especializadas, como los eritrocitos, cuando es necesario transportar eficientemente O₂ a sitios especiales de intensa actividad respiratoria. También se generan cantidades pequeñas de proteínas como la mioglobina y la hemoglobina no simbiótica de las plantas cuando es necesario un rápido sistema intracelular de liberación de O₂, como en la mitocondria o el cloroplasto²⁴. Cuando el sistema de transporte de electrones no está separado del compartimiento intracelular, como en las bacterias, las hemoglobinas pueden ser usadas, bajo condiciones hipóxicas, para liberar oxígeno como aceptor terminal de electrones. Por tanto, existe una conexión evolutiva entre las hemoglobinas que transportan O₂, los citocromos que pasan electrones a través de la cadena respiratoria y la fotosíntesis, y las demás hemoproteínas que catalizan reacciones redox. Quizá 1.800 millones de años atrás los anillos de porfirina unidos a un metal evolucionaron junto con la fotosíntesis y la consiguiente aparición del O₂ en la atmósfera, a partir de un gen ancestral común (Figura 3).

Pronto en la evolución se incorporó la utilidad de los anillos de porfirina unidos a un metal para la transferencia de electrones. Tal es el caso de los citocromos que transportan electrones en la cadena respiratoria, u otras hemoproteínas que catalizan una clase variada de reacciones de óxido-reducción. Aun en la fotosíntesis, los anillos de porfirina transportan los electrones generados a partir de la luz solar y el agua para luego generar ATP. Otras hemoproteínas se han adaptado para unir reversiblemente el oxígeno generado en la fotosíntesis y transportarlo a cada célula de todos los grupos de organismos: procariotas, hongos, plantas y animales^{24,25}.

La hemoglobina animal puede ser fácilmente aislada en forma tetramérica, conteniendo dos cadenas polipeptídicas α -globina y dos β -globina. Cada monómero de globina posee un grupo prostético hem. La secuencia de aminoácidos de las cadenas α y β globina son idénticas en 50%, indicando que los dos genes que las codifican son descendientes de un ancestro común, 450 millones de años atrás. Estudios posteriores²⁶⁻²⁸

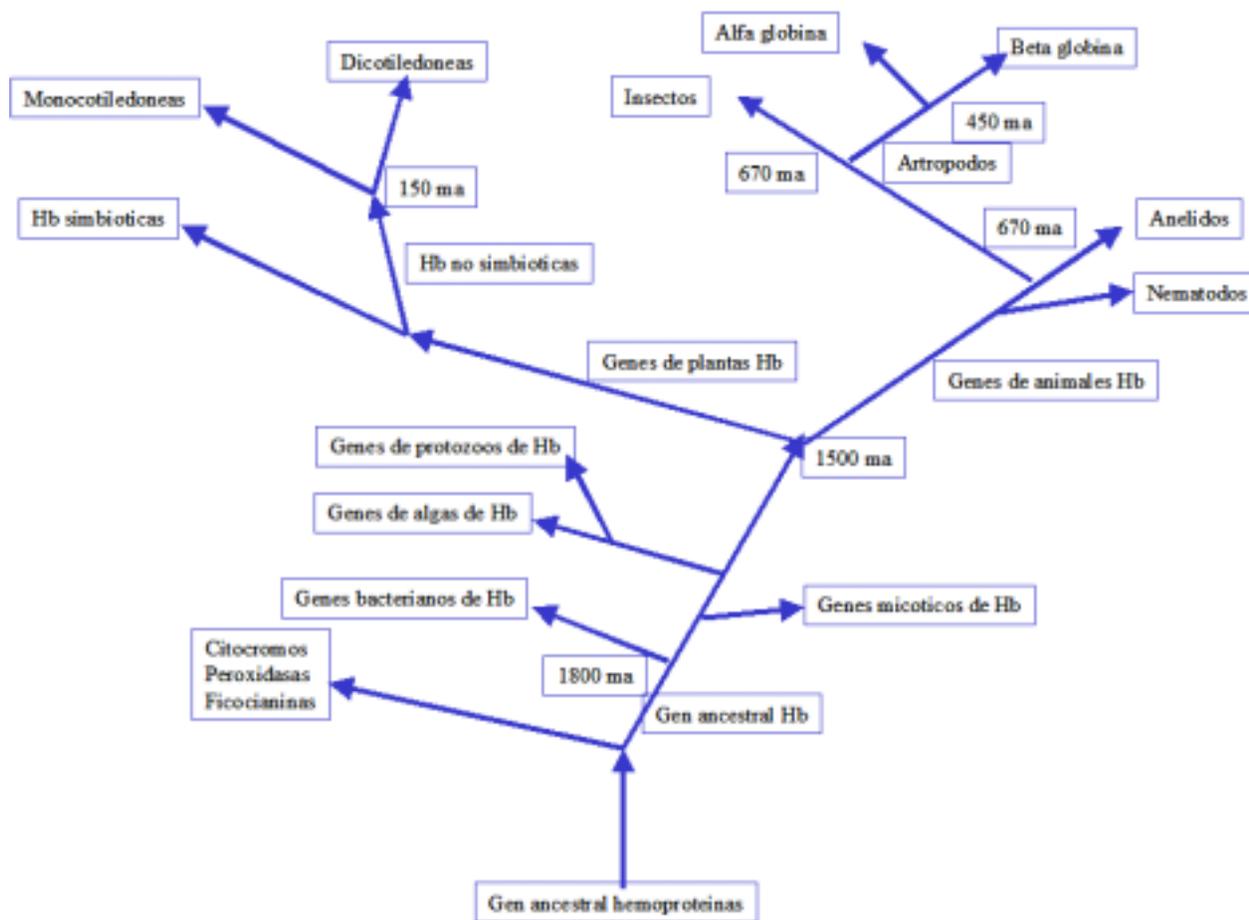


Figura 3. Evolución del gen de la hemoglobina (ma: millones de años)

encontraron hemoglobinas en diferentes invertebrados: artrópodos, anélidos y nemátodos. Estas hemoglobinas están relacionadas claramente con las hemoglobinas de los vertebrados en cuanto a su estructura primaria, lo que sugiere un gen ancestral común para vertebrados e invertebrados, de 670 millones de años²⁹.

Las plantas utilizan la hemoglobina para unir y transferir oxígeno a las mitocondrias durante la respiración. Fue descubierta en los nódulos de las raíces de las legumbres³⁰. Estos nódulos representan una actividad simbiótica con bacterias *Rhizobium* que permiten la fijación (reducción) del nitrógeno atmosférico para la eventual síntesis de aminoácidos para la planta. Este proceso requiere grandes cantidades de energía; los nódulos contienen una abundante hemoglobina denominada leghemoglobina, que facilita la difusión de oxígeno a la cadena respiratoria bacteriana. Además, constituye un mecanismo de secuestro de oxígeno, que mantiene al sistema reductor de nitrógeno libre de oxígeno, el cual es lesivo para

dicha maquinaria. Aunque la secuencia de aminoácidos de las leghemoglobinas difiere en 80% de las hemoglobinas de los vertebrados, sus estructuras tridimensionales son idénticas.

El descubrimiento de hemoglobinas en una gran variedad de plantas soporta el modelo de la leghemoglobina como un producto especializado de un gen común propio de las plantas, que codifica para hemoglobina. La presencia de hemoglobinas, distintas a la leghemoglobina, en plantas no leguminosas (*Parasponia andersonni*) está relacionada también con la fijación simbiótica de nitrógeno. Sin embargo, estudios posteriores demostraron la existencia de hemoglobina extranuclear con funciones no simbióticas, posiblemente relacionadas con el transporte de O₂ en la planta *Trema tomentosa*³¹. Se describen entonces dos tipos de hemoglobinas en las plantas: simbióticas y no simbióticas, codificadas por un gen ancestral y al parecer común con el gen animal³² 1500 millones de años atrás.

Varios estudios confirman que el gen de la hemoglobina

es verdaderamente ancestral y precede a la divergencia de procariotas y eucariotas. Dicho gen se encuentra en protozoarios como la *Tetrahymena* y el *Paramecium*, así como en las algas *Chlamydomonas*. Ha sufrido a lo largo de la evolución modificaciones diferenciales en sus intrones pero ha conservado la función de codificar una proteína que transporta y libera O_2 . La levadura *Saccharomyces* presenta una flavohemoglobina al parecer relacionada con funciones de regulación y señalización celular³³. El nemátodo *Ascaris suum*, posee una hemoglobina que cataliza la desoxigenación dependiente de óxido nítrico, manteniendo plenamente la oxidación mitocondrial anaeróbica a nivel intestinal³⁴. De la misma forma, se han encontrado hemoglobinas en muchas bacterias entre las que se incluyen *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*, *Vitreoscilla*, *Nostrac commune*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, entre otras, donde cumplen funciones como la catálisis de reacciones redox, el transporte y liberación de O_2 y el metabolismo del óxido nítrico.

NUEVAS GLOBINAS

Recientemente se ha descubierto, en las secuencias de ADN complementario, un tercer tipo de globina en ratones y en humanos denominada neuroglobina (NGB)³⁵. El gen codifica en ambas especies, una proteína de 151 aminoácidos (masa molecular de 17,000). Dicha proteína es en 94% similar entre el ratón y el hombre, mientras que la similitud de ésta con la Hb y la mioglobina humana es de tan sólo 25% y 21% respectivamente. Lo anterior sugiere que es una proteína altamente conservada a través de la evolución (670 millones de años aproximadamente) y que, aunque hace parte de la superfamilia de las globinas, tiene una función diferente. Se demostró espectroscópicamente, que la NGB es la primera hemoglobina hexacoordinada caracterizada en vertebrados³⁶. La hexacoordinación es un mecanismo que regula la unión del ligando con las proteínas hémicas, a través de la competición entre un ligando externo y uno interno por una cadena de aminoácidos (histidina distal). Con base en lo anterior se sugieren diversas funciones de la NGB: como transportador de O_2 y facilitador de su difusión a la mitocondria; como enzima, facilitando la generación glicolítica de ATP; como sensor de O_2 ; y como detoxificador de óxido nítrico³⁷⁻⁴⁰.

El análisis del patrón de expresión en diferentes tejidos resalta una mayor presencia de NGB en el cerebro, sobre todo en el lóbulo frontal, el núcleo subtalámico y el tálamo (Cuadro 2). La concentración de esta proteína en el cerebro

Cuadro 2
Expresión tisular de NGB

Tejido cerebral	Expresión (%)	Otros tejidos	Expresión (%)
Núcleo subtalámico	100	Hipófisis	62
Lóbulo frontal	73	Apéndice	25
Tálamo	73	Glándula adrenal	21
Polo occipital	70	Pulmón	19
Cerebro fetal	34	Colon	10

del ratón es menor a 0.01% del contenido proteico total. La NGB se expresa como un monómero que une reversiblemente O_2 . Su espectro de absorción tiene tres picos en 424, 528 y 558 nm en la forma desoxi-NGB, y un solo pico en 413 nm como oxí-NGB. Aunque los picos en el ultravioleta son similares a los de otras globinas, el espectro visible es inusual, e indica la presencia de un grupo hem de bajo spin, como el observado en las fibras nerviosas del molusco *Spisula solidissima*. La NGB recombinante tiene una afinidad por el O_2 de 1.9 a 2.3 torr, muy superior a la de la Hb de mamíferos (27 torr), pero inferior a la de la mioglobina (1 torr). El gen de la NGB está ubicado en 14q24. posee tres intrones en las posiciones B12-2 (hélice B, aminoácido 12, codón 2), E11-0 y G7-0. Los intrones B12-2 y G7-0 se conservan en las hemoglobinas y mioglobinas de los vertebrados y de otras familias taxonómicas. El intrón central, E11-0, puede representar un caso de adquisición independiente de un intrón.

La presencia de un tercer tipo de globina, constituye un importante modelo para el estudio de la evolución de las especies. Adicionalmente, constituye una proteína especializada en incrementar la presión de O_2 en tejidos específicos, diferentes al músculo. Sin embargo, se han observado globinas en el sistema nervioso de subfamilias de invertebrados, como anélidos, moluscos y nemátodos. Las propiedades de unión de O_2 de la NGB son semejantes a las de la mioglobina de los vertebrados, lo que sugiere una función similar, pero a nivel cerebral. A pesar de su baja concentración, la NGB puede suplir de O_2 al cerebro, atravesando la barrera hematoencefálica.

Al igual que la NGB, la citoglobina (Cygb) fue encontrada en las bases de datos de ADN complementario del ratón y el humano⁴¹. Los análisis filogenéticos sugieren que la Cygb y la mioglobina forman un clan común dentro del árbol de las globinas de los vertebrados. Estos genes se separaron hace aproximadamente 450 millones de años. En este escenario evolutivo, la mioglobina parece ser una especialización muscular de una globina intracelular que tiene una amplia distribución tisular y una función general. El gen de la Cygb se

encuentra en 17q25. La conservación de las secuencias entre la Cygb de ratón y la humana es de 96%. Los residuos claves en la estructura y función respiratoria de las globinas, PheCD1, HisE7 e HisF8, están conservados en la Cygb. Además, esta proteína pertenece a las hemoglobinas hexacoordinadas recientemente descritas.

El papel fisiológico de las hemoglobinas pentacoordinadas de los vertebrados está bien definido: el transporte de O₂ por la Hb y la difusión facilitada y el almacenamiento de O₂ por la mioglobina. Sin embargo, esta situación es menos clara para las hemoglobinas hexacoordinadas. Al parecer, tanto la NGB como la Cygb, comparten las mismas propiedades estructurales y fisiológicas⁴².

OXIDACIÓN Y REDUCCIÓN

La oxihemoglobina en solución se autooxida y transforma en metahemoglobina (metHb-Fe+3). Sin embargo, para lograr la fijación reversible del O₂, el hierro del hem debe mantenerse en estado reducido (Ferroso, Fe+2) a pesar de la exposición a diversos oxidantes endógenos o exógenos. Entre estos se encuentran ciertos medicamentos oxidantes y algunas toxinas. Para evitar la inactivación funcional de la Hb, el eritrocito cuenta con una eficiente maquinaria reductora.

La oxidación de la Hb es escalonada. Los compuestos intermedios se denominan híbridos de valencia y son el resultado de la liberación de O₂ molecular por parte de la oxiHb que termina generando aniones superóxido o peróxido que oxidan entonces el hierro Fe+2 a Fe+3. Normalmente se genera 0.5% a 3% de metHb al día⁴³.

A medida que la desnaturalización progresa, la metHb se convierte en hemicromos. Estos aparecen cuando la sexta posición de coordinación del hierro se une de manera covalente con un ligando en la molécula de Hb (histidina distal-E7), lo que distorsiona la estructura terciaria. Los hemicromos pueden ser reversibles o irreversibles dependiendo del grado de distorsión de la molécula de Hb y la capacidad potencial de la enzima metahemoglobina reductasa de reducirlos. Cuando los fenómenos oxidativos facilitan la disrupción de los contactos $\alpha_1\beta_2$, se produce la disociación de las cadenas polipeptídicas en dímeros y monómeros que precipitan y constituyen las inclusiones cocoides intraeritrocitarias denominadas cuerpos de Heinz, que se unen a la membrana y acortan la vida del glóbulo rojo¹.

La reducción de la metHb se produce básicamente por acción de la enzima citocromo b metahemoglobina reductasa (67% de participación), que opera en presencia de dos

portadores de electrones, el citocromo b y el NADH+H. La reducción también se produce por otros agentes como el ácido ascórbico (16%), el glutatión (12%) y la enzima NADPH-flavina reductasa (5%). Las pruebas *in vitro* demuestran que la metahemoglobina reductasa es el factor limitante de la reducción de metHb. El gen se localiza en el cromosoma 22⁴⁴ y su deficiencia se asocia clínicamente con metahemoglobinemia⁴⁵.

A medida que el O₂ sufre reducciones univalentes, se generan especies reactivas que constituyen los oxidantes responsables de la desnaturalización, no sólo de la Hb, sino de los demás componentes eritrocitarios, tales como los lípidos de la membrana, lo cual conduce a lisis celular⁴⁶. Entre estos derivados están los aniones superóxido, peróxido y los radicales hidroxilo. Para evitar en alguna medida este daño oxidativo, el organismo cuenta con ciertos mecanismos que impiden la acumulación de estas toxinas; algunos se ubican dentro de los eritrocitos. Dentro de estos se encuentran: la superóxido dismutasa, que cataliza la dismutación del superóxido a oxígeno molecular y peróxido; la catalasa, que separa al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Además interactúa con la membrana en forma dependiente del Ca+2 y el pH y funciona como un reservorio de NADPH⁴⁷, y finalmente, la glutatión peroxidasa, principal selenoproteína del organismo (hecho que explica posiblemente las propiedades antioxidantes de este micronutriente)⁴⁸, que cataliza la conversión de peróxido a agua, oxidando el glutatión. La alteración genética de la glutatión peroxidasa provoca anemia hemolítica inducida por medicamentos. El glutatión es el cofactor fundamental de la glutatión peroxidasa. Constituye además el principal agente reductor de los eritrocitos y su síntesis requiere de dos reacciones:

1. **Ácido glutámico + cisteína** \longrightarrow **γ -glutamil-cisteína**
2. **γ -glutamil-cisteína + glicina** \longrightarrow **GSH**

La primera reacción está catalizada por la glutamil-cisteína sintetasa y la segunda por la glutatión sintetasa⁴⁹. El proceso que evita la oxidación de la Hb requiere la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). Para ello es necesario un sistema que mantenga un suministro continuo de GSH. Este sistema está representado por la glutatión reductasa, que cataliza la reducción de GSSG a GSH, con la participación del NADPH, producido en la vía de las pentosas fosfato. Cualquier alteración en alguna parte de esta vía de síntesis del GSH conduce eventualmente a hemólisis.

HEMOGLOBINA Y ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El óxido nítrico es un mensajero biológico que participa en la neurotransmisión, en la regulación vascular y en la respuesta inmune. Es producido por muchos tipos de células como las neuronas, el endotelio, las células musculares lisas vasculares y los macrófagos. Reacciona con la desoxiHb y la oxiHb para formar nitrosilHb (HbNO) y metHb más nitrato, respectivamente. Las constantes de estas reacciones están en el orden de $3-5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$, que significa una vida media de 1 μseg para el NO. Con esta vida tan corta, la concentración de NO no sería suficiente para activar a la guanilato ciclasa y no produciría sus conocidos efectos de vasodilatación. Además, la Hb libre se ha presentado como un «barrendero» muy eficiente de NO, lo que disminuye aún más la biodisponibilidad de este mensajero. Sin embargo, normalmente la Hb está encapsulada en los eritrocitos, permitiendo preservar la función de la molécula de NO por varios mecanismos fisiológicos aún no entendidos del todo.

Varias teorías intentan explicar este fenómeno. Una de ellas, establece que el NO entra en el eritrocito uniéndose de manera cooperativa al hem de la Hb, formando HbNO, limitando entonces la formación de metHb⁵⁰. Luego, la HbNO transfiere el NO a los grupos tiol (-SH) de $\beta 93\text{Cys}$ para formar S-NitrosoHb (SNO-Hb). La S-nitrosilación de la Hb ocurre sobre todo en la estructura R (alta tensión de O_2 -pulmones-), mientras que la liberación del NO se produce en la transición a la estructura T (bajas tensiones de O_2 -capilares-). Después, el NO se exporta, como un equivalente de NO bioactivo (X-SNO), a la membrana del eritrocito a través de una proteína de intercambio aniónico, la banda 3. Así, el intercambio de grupos NO entre SNO-Hb y la membrana eritrocitaria está gobernado por la tensión de O_2 (PO_2): los eritrocitos dilatan los vasos sanguíneos a bajas PO_2 , siendo requerida la producción de nitroso-tioles (SNO) a nivel de la membrana eritrocitaria^{51,52}.

Se establece además que la bioactividad del NO se preserva gracias a limitaciones en las interacciones entre el NO y el eritrocito. Estas barreras incluyen: 1) la propia membrana eritrocitaria⁵³; 2) una capa libre de eritrocitos en los vasos sanguíneos inducida por el flujo laminar de sangre⁵⁴ y 3) el citoesqueleto eritrocitario⁵⁵. De esta forma se logra que el consumo de NO por parte del eritrocito sea aproximadamente 800 veces menor que el consumo por parte de la Hb libre.

Finalmente, cabe anotar que aunque la hemoglobina es la proteína mejor caracterizada en todos sus aspectos, y que se

ha consolidado como un modelo de estudio en bioquímica y fisiología, todavía falta mucho por descubrir acerca de su función y de sus interacciones con otras moléculas. Cuando se alcance este conocimiento se podrán desarrollar o mejorar nuevas estrategias terapéuticas, por ejemplo, los sustitutos de la sangre en el campo de la medicina transfusional, la sobre expresión de la chaperona de la hemoglobina en pacientes con β -talasemia y el uso terapéutico del NO y de las proteínas que se expresan en condiciones de hipoxia-isquemia.

REFERENCIAS

1. Telen M. Eritrocitos maduros. *En: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens J, Lukens J (eds.). Wintrobe Hematología clínica.* Buenos Aires: Intermédica; 1994. p. 80-105.
2. Schultz R. Proteínas fisiológicas. *En: Devlin T (ed.). Bioquímica.* Barcelona: Reverté; 1993. p. 95-133.
3. Perutz MF. Structure and mechanism of haemoglobin. *Br Med Bull* 1976; 32: 195-208.
4. Marbaix G, Burny A. Separation of the messenger RNA of reticulocyte polyribosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1964; 16: 522-527.
5. Proudfoot N, Brownlee G. Nucleotide sequences of globin messenger RNA. *Br Med Bull* 1976; 32: 251-256.
6. Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* 1956; 178: 792-794.
7. Monod J, Wyman G, Changeux J. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* 1965; 12: 88-118.
8. Paul J. Haemoglobin synthesis and cell differentiation. *Br Med Bull* 1976; 32: 277-281.
9. Pauling L. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 1949; 110: 543-548.
10. Demaria R, Zeuner A, Eramo A, *et al.* Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 1999; 401: 489-493.
11. Luzzatto L, Notaro R. Haemoglobin's chaperone. *Nature* 2002; 417: 703-705.
12. Adamson SD. Factors affecting the rate of protein synthesis in lysate systems from reticulocytes. *Arch Biochem Biophys* 1968; 125: 671-683.
13. Howard GA. Studies on cessation of protein synthesis in a reticulocyte lysate-free system. *Biochim Biophys Acta* 1970; 213: 237-240.
14. Raffel C. Role for heme in mammalian protein synthesis: activation of an initiation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 4020-4024.
15. Kristiansen M, Graversen J, Jacobsen C, *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409: 198-201.
16. Lehmann H, Carrell RW. Variations in the structure of human hemoglobin. With particular reference to the unstable haemoglobins. *Br Med Bull* 1969; 25: 14-23.
17. Perutz MF. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 1970; 228: 726-739.
18. Baldwin BA. A model of co-operative oxygen binding to

- haemoglobin. *Br Med Bull* 1976; 32: 213-218.
19. Kilmartin MA. Interaction of haemoglobin with protons, CO₂ and 2,3-diphosphoglycerate. *Br Med Bull* 1976; 32: 209-212.
 20. Chanutin A, Curnish RR. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1967; 121: 96-102.
 21. Daugherty MA. Identification of the intermediate allosteric species in human hemoglobin reveals a molecular code for cooperative switching. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1110-1114.
 22. Lenfant C. Effect of altitud on oxygen binding by hemoglobin on organic phosphate levels. *J Clin Invest* 1968; 47: 2652-2656.
 23. Huehns DE. Human embryonic hemoglobins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1964; 29: 327-331.
 24. Hardison R. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist and bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5675-5679.
 25. Hardison R. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J Exp Biol* 1998; 201: 1099-1117.
 26. Riggs AF. Self-association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins. *J Exp Biol* 1998; 201: 1073-1084.
 27. Dixon B, Walker B, Kimmins W, *et al.* A nematode hemoglobin gene contains an intron previously thought to be unique to plants. *J Mol Evol* 1992; 35: 131-136.
 28. Sherman D, Kloel A, Krishnan R, *et al.* *Ascaris* hemoglobin gene: plant-like structure reflects the ancestral globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11696-11700.
 29. Goodman M, Pedwaydon J, Czekusniak J, *et al.* An evolutionary tree for invertebrate globin sequences. *J Mol Evol* 1988; 27: 236-249.
 30. Appleby CA, Bradbury JH, Morris RJ, Wittenberg BA, Wittenberg JB, Wright PE. Leghemoglobin. Kinetic, nuclear magnetic resonance, and optical studies of pH dependence of oxygen and carbon monoxide binding. *J Biol Chem* 1983; 258: 2254-2259.
 31. Bogusz D, Appleby C, Landsmann J, *et al.* Nonlegume hemoglobin genes retain organ-specific expression in heterologous transgenic plants. *Nature* 1988; 331: 178-180.
 32. Andersson C, Jensen E, Llewellyn D, *et al.* A new hemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin all plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5682-5687.
 33. Crawford M, Sherman D, Goldberg D. Regulation of *saccharomyces cerevisiae* flavohemoglobin gene expression. *J Biol Chem* 1995; 270: 6991-6996.
 34. Minning D, Gow A, Bonaventura J, *et al.* *Ascaris* haemoglobin is a nitric oxide-activated deoxygenase. *Nature* 1999; 401: 497-502.
 35. Burmester T, Weich B, Reinhardt S, *et al.* A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* 2000; 407: 520-523.
 36. Trent J, Watts R, Hargrove M. Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen. *J Biol Chem* 2001; 276: 30106-30110.
 37. Dewilde S, Kiger L, Burmester T, *et al.* Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J Biol Chem* 2001; 276: 38949-38955.
 38. Mammen P, Shelton J, Goetsch S, *et al.* Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 1591-1598.
 39. Couture M, Burmester T, Hankeln T, *et al.* The heme environment of mouse neuroglobin. *J Biol Chem* 2001; 276: 36377-36382.
 40. Sun Y, Jin K, Mao X, *et al.* Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 15306-15311.
 41. Burmester T, Ebner B, Weich B, *et al.* Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol* 2002; 19: 416-421.
 42. Pesce A, Bolognesi M, Bocedi A, *et al.* Neuroglobin and Cytoglobin: fresh blood for the vertebrate globin family. *Embo Rep* 2002; 3: 1146-1151.
 43. Eaton J, Brewer G. Pentose phosphate metabolism. *En: Surgenor D (ed.) The red blood cell.* New York: NY Academic Press; 1974. p. 436-465.
 44. Bull PC. Cloning and chromosomal mapping of human cytochrome b5 reductase (dia1). *Ann Hum Genet* 1988; 52: 263-268.
 45. Sass MD. TPNH-methemoglobin reductase deficiency. A new red cell enzyme defect. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 760-767.
 46. Carrell LW, Winterbourn CC, Rashmlewitz EA. Activated oxygen and hemolysis. *Br J Haematol* 1975; 30: 259-264.
 47. Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of naph. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4343-4347.
 48. El-bayoumy K. The protective role of selenium on genetic damage on cancer. *Mutation Res* 2001; 475: 123-139.
 49. Minnich V. Glutathione biosynthesis in human erythrocytes I. Identification of the enzymes of glutathione synthesis in hemolysates. *J Clin Invest* 1971; 50: 507-513.
 50. Gow A, Luchsinger B, Paeloski J, *et al.* The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9027-9032.
 51. Stamler J. S-nitrosothiols in the blood. Roles, amounts, and methods of analysis. *Circ Res* 2004; 94: 414-417.
 52. Gladwin M, Schechter A. NO contest. Nitrite versus S-nitroso-hemoglobin. *Circ Res* 2004; 94: 851-855.
 53. Vaughn M, Huang K, Kuo L, *et al.* Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption. *J Biol Chem* 2000; 275: 2342-2348.
 54. Liao J, Hein T, Vaughn M, *et al.* Intravascular flow decrease erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8757-8761.
 55. Huang K, Han T, Hyduke D, *et al.* Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 11771-11776.