

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Coordinación de la α -quimotripsina y de la tripsina con la hematina

I. Obtención y propiedades de los hemocromos

por

L. Cornudella y F. Calvet

(Recibido para publicar el 14 de mayo de 1968)

La hematina* en disolución alcalina diluida reacciona con gran variedad de bases nitrogenadas (1, 12, 16), formando complejos hexacoordinados (ferrihemocromos) (4), los cuales, por reducción con ditionito sódico, se transforman en los correspondientes ferrohemocromos. Estos hechos bien conocidos sugieren la posibilidad de su combinación con distintas proteínas cuyos grupos básicos *formadores de hemocromo*, accesibles gracias a una desnaturalización proteica previa, y en disposición estérica favorable, pueden ocupar las posiciones de coordinación 5.ª y 6.ª de la metaloporfirina (11).

Entre las diversas interpretaciones propuestas respecto de la naturaleza de las uniones de la hematina con los grupos específicos responsables de las proteínas, particularmente en el caso de la hemoglobina (10, 19), la más aceptada es la que implica la intervención del núcleo imidazólico de la histidina (3, 18, 23). A pesar de la afinidad que los compuestos imidazólicos exhiben por la hematina, parece poco probable, sin embargo, que sea la histidi-

na el grupo de enlace proteico exclusivo. En general, el incremento de la capacidad de combinación observado en las proteínas progresivamente álcali-desnaturalizadas sustenta esta apreciación (14).

Con este trabajo se pretende contribuir al mejor conocimiento de la naturaleza de las combinaciones de la hema y de la hematina con las proteínas desnaturalizadas, mediante el estudio de los ferro- y ferrihemocromos de proteínas de bajo contenido en histidina —tales como los enzimas α -quimotripsina y tripsina (8)—, principalmente basado en las características espectrales de los respectivos compuestos.

* En el presente trabajo se han seguido las recomendaciones sobre nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica (véase referencia 4). Se designa como ferriprotoporfirina IX (hematina) al soluto de las disoluciones alcalinas de clorohemina. El término ferrihemocromo se aplica a las combinaciones de la hematina con bases nitrogenadas, denominándolas ferrohemocromos cuando el átomo de hierro se halla en estado reducido.

Material y métodos

La clorohemina cristalizada utilizada procedía de General Biochemicals, y se recrystalizó previamente en CHCl_3 -piridina (6). Debido a la agregación progresiva que experimentan las partículas de hematina en disolución alcalina, como norma general se utilizaron disoluciones recién preparadas, salvo en las ocasiones que expresamente se indica, en las que se conservaron por poco tiempo a baja temperatura (4°C) y protegidas de la luz. Su preparación se practicó disolviendo la cantidad de clorohemina recrystalizada precisa para proporcionar una concentración final de $0,6 \times 10^{-3} \text{ M}$, utilizando el mínimo volumen de NaOH 0,05 N necesario, y diluyendo al volumen definitivo con agua destilada.

Los enzimas α -quimotripsina y tripsina cristalizados nos fueron suministrados por los Laboratorios P.E.V.Y.A., Barcelona, en forma dializada y liofilizada.

El ditionito sódico (hidrosulfito o hiposulfito sódico) procedía de Merck. El contenido de los recipientes originales, después de abiertos y de comprobar que no desprendían olor a SO_2 , se distribuyó en ampollas de tamaño reducido, conservándolas herméticamente cerradas. Las disoluciones acuosas al 2 % (p/v) del reductor se prepararon inmediatamente antes de su uso, a partir de ampollas recién abiertas.

La pureza de las proteínas enzimáticas citadas se comprobó determinando los factores de densidad óptica a $280 \text{ m}\mu$ (9, 22) de disoluciones de las mismas de concentraciones conocidas.

COMBINACIONES DE LA HEMATINA CON LAS PROTEÍNAS ÁLCALI-DESNATURALIZADAS. A 0,5 ml de hematina $0,6 \times 10^{-3} \text{ M}$ se añadía 1 ml de disoluciones de distinta concentración de las proteínas en NaOH 0,1 N; el volumen de la mezcla se completaba a 6 ml por adición de hidróxido sódico 0,1 N. Inmediatamente de preparadas las mezclas de reacción se determinaba su espectro visible de absorción. Según

conveniencia, se repetían las lecturas a intervalos de tiempo regulares.

Para el registro espectral de los ferrohemocromos se incorporaba 0,1 ml de disolución acuosa de ditionito sódico al 2%, recién preparada, directamente en las mismas cubetas del espectrofotómetro, que contenían unos 4 ml de mezcla, y se tapaban a continuación. En el interior de las cubetas restaba una pequeña burbuja de aire que facilitaba el mezclado al invertir las cuidadosamente. Para las medidas espectrales en la región de Soret las disoluciones se diluyeron previamente (1:5) con NaOH 0,1 N.

VALORACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS. El estudio cuantitativo del sistema *hematina (oxidada o reducida) proteína desnaturalizada* se llevó a cabo mediante valoraciones espectrofotométricas en las longitudes de onda correspondientes a los respectivos máximos de absorción de los compuestos.

Para las determinaciones en la zona visible del espectro se prepararon disoluciones de hematina $6 \times 10^{-4} \text{ M}$ y de cada una de las proteínas $7,5 \times 10^{-4} \text{ M}$. La disolución de hematina se diluyó al doble con hidróxido sódico para obtener una concentración de $3 \times 10^{-4} \text{ M}$. Por dilución con NaOH 0,1 N de las disoluciones de partida de las proteínas se prepararon varias disoluciones de concentraciones decrecientes. A 1 ml de disolución de proteína de concentración variable se añadían 0,5 ml de hematina $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ y 4,5 ml de NaOH 0,1 N. Las extinciones exhibidas por las mezclas resultantes se leían inmediatamente, previa adición del reductor, en el caso de los ferrohemocromos. Las disoluciones de los ferrihemocromos se conservaron en atmósfera de oxígeno durante cuatro horas, transcurridas las cuales se determinaba su absorción.

Para las mediciones en la región espectral de Soret se diluyeron todas las disoluciones en la forma anteriormente descrita. Los resultados de las valoraciones

se dedujeron mediante representaciones gráficas.

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron mediante un espectrofotómetro Beckman DU tipo G 4700, previamente estandarizado (20) y en cubetas de 10 mm de espesor.

INFLUENCIA DEL pH EN LA AFINIDAD DE LAS PROTEÍNAS POR LA HEMA. El incremento de extinción en la banda α (554 $m\mu$) del ferrohemocromo de cada proteína presentado por disoluciones mezcla de protohema y de las proteínas, reguladas a distintos pH, se consideró como medida de la afinidad de la proteína por la ferroporfirina. En la práctica, a 1 ml de disolución de proteína 6×10^{-4} M en HCl 0,025 N se añadieron 1 ml de protohematina 3×10^{-4} M y 10 ml de la disolución regulada correspondiente. Con una parte alícuota de las disoluciones anteriores contenida en las cubetas de medición se efectuó la lectura de la absorción después de añadir reductor en la forma antes descrita. La zona de pH estudiada abarcó desde pH 7 a pH 12. Las disoluciones tampón utilizadas para ello fueron: a) fosfatos 0,1 M para el margen comprendido entre pH 7 y 8. b) Glicina, NaCl-NaOH 0,1 M para los restantes pH.

Todas las experiencias fueron realizadas a la temperatura ambiente (20-22° C).

Las medidas de la concentración en ion hidrógeno se practicaron con ayuda de un medidor de pH Radiometer PHM 22 acoplado a un amplificador de escala PHA 630P. A pesar de introducirse correcciones en las medidas, las lecturas a pH elevados no se consideraron como exactas.

ELECTROFORESIS DE LAS COMBINACIONES HEMATINA - PROTEÍNA DESNATURALIZADA. Una caracterización adicional de los ferrohemocromos de las proteínas desnaturalizadas por álcali se llevó a cabo por electroforesis de zona sobre soporte de membrana de acetato de celulosa. Partiendo de disoluciones de las proteínas de concentración $7,5 \times 10^{-3}$ M en álcali 0,5 N y de

hematina 6×10^{-3} M, se mezclaron 2 ml de la disolución de proteína con 1 ml de la de hematina. Las disoluciones resultantes se dejaron en reposo a la temperatura ambiente durante 20 horas. Después se procedió al desarrollo electroforético de las distintas combinaciones, depositando 10 μ l de las disoluciones sobre las tiras de celulosa. Las electroforesis se realizaron en disolución reguladora de Glicina · NaCl-NaOH 0,1 M pH 12, durante 90 minutos, utilizando una d.d.p. de 125 voltios.

Los electrogramas se estudiaron por observación visual de las tiras con ayuda de una lámpara de UV de baja presión, o bien, por revelado del pigmento mediante el reactivo de bencidina- H_2O_2 (7).

Los ensayos electroforéticos se efectuaron en una cámara húmeda tipo Kohn con soporte de filtro de membrana de acetato de celulosa (Cellogel).

Resultados

Las disoluciones alcalinas de tripsina y de α -quimotripsina que contienen hematina exhiben, una vez reducidas por $Na_2S_2O_4$, el espectro de absorción genuino de los ferrohemocromos. La absorción de ambas combinaciones se caracteriza por dos máximos en la zona visible (bandas α y β) localizadas a 554 $m\mu$ y 526 $m\mu$, respectivamente. En la región de Soret aparece una sola banda a 412 $m\mu$. Las figuras 1 y 2 muestran los espectros de absorción hallados de los ferrohemocromos de la tripsina y de la α -quimotripsina.

La estabilidad de la absorción de las disoluciones anteriores, sin adición del reductor, no se consigue hasta después de transcurrido un intervalo de tiempo considerable. En algunas ocasiones se observó que la absorción exhibida por dichas disoluciones no correspondía a la del ferrohemocromo — como cabía esperar — sino por el contrario, se registraba el espectro de la forma reducida. Este hecho condujo a suponer que era la propia proteína desnaturalizada la inductora del fe-

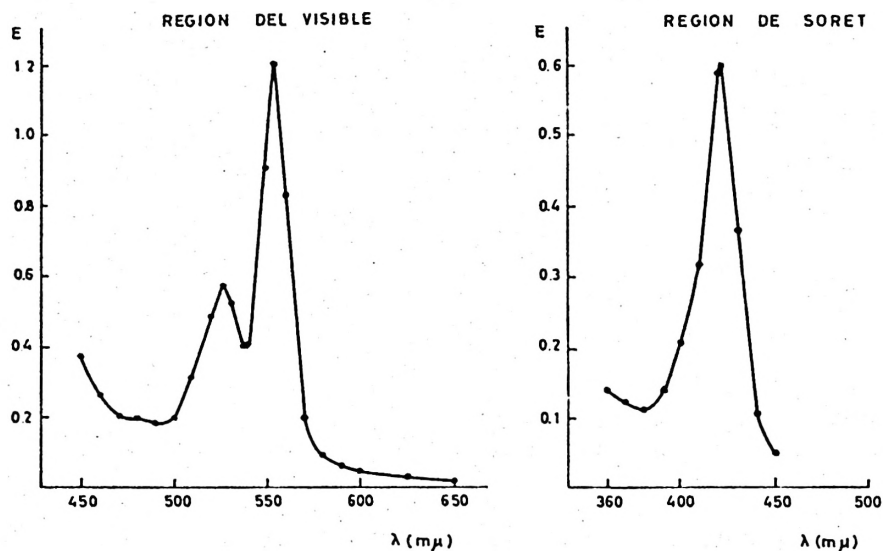


FIG. 1. Espectro de absorción del ferrohemocromo de la tripsina álcali-desnaturalizada. Región visible: Hematina: 5×10^{-5} M. Tripsina: 5×10^{-5} M. Relación molar (R_M) Proteína/Hematina: 1/1.

Región de Soret: La disolución anterior diluida (1 : 10) con NaOH 0,1 N. Reductor: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 2 % (p/v).

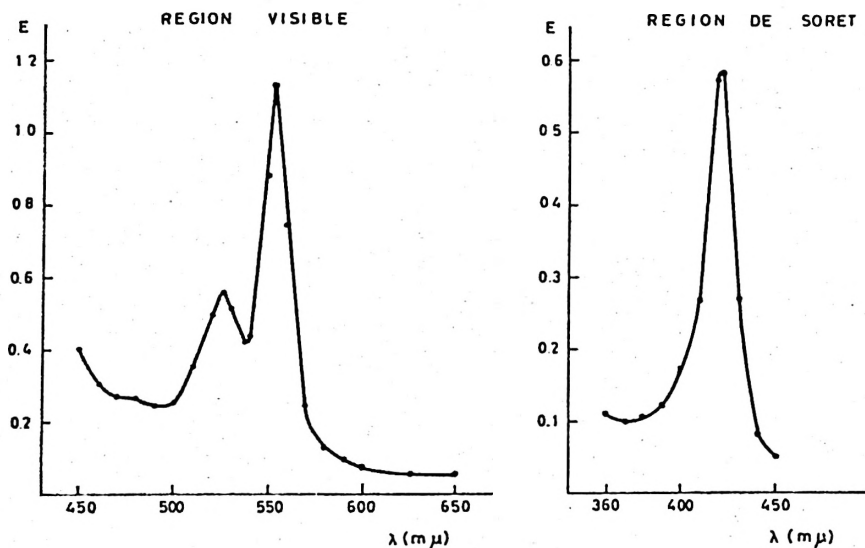


FIG. 2. Espectro de absorción del ferrohemocromo de la α -quimotripsina álcali-desnaturalizada.

Región visible: Hematina: 5×10^{-5} M. α -Quimotripsina: $1,25 \times 10^{-5}$ M. R_M Proteína/Hematina: 1/4.

Región de Soret: Dilución (1 : 10) con NaOH 0,1 N de la disolución anterior. Reductor: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 2 %.

nómeno reductor provocado, y se comprobó que el mantenimiento de las disoluciones en atmósfera de oxígeno impedía totalmente su manifestación. Parecido resultado se obtenía abandonando las disoluciones, que habían exhibido previamente el espectro del compuesto reducido, en contacto con un ambiente aerobio. A su vez, se pudo observar que el incremento del valor de la relación molar proteína/hematina, esto es, el aumento de la concentración molar de las proteínas en disolución, favorecía la reducción citada; y lo mismo ocurre cuando se opera con las disoluciones en atmósfera de gas inerte. La descripción detallada del fenómeno, de los factores que las condicionan, así como de los resultados alcanzados, se describen en la parte II de este trabajo.

En la figura 3 se muestra la variación espectral en función del tiempo experimentada por una disolución alcalina de α -quimotripsina que contiene hematina. Una parte alícuota de la misma, abandonada en reposo, exhibe, durante las pri-

meras horas, las bandas de absorción típicas del ferrohemocromo. Pero después de transcurridas 24 horas, el espectro coincide con el del ferrihemocromo.

Estas observaciones nos indujeron a realizar en atmósfera aerobia todas las experiencias de estudio de ferrihemocromos.

Como puede apreciarse en la gráfica de la figura 3, el ferrihemocromo de la α -quimotripsina presenta una banda β ancha, situada a unos 530 $m\mu$, mientras que la α , más débil y difusa, se muestra tan sólo en forma de hombro entre los 550 y 560 $m\mu$. En la región de Soret la absorción máxima se localiza a 393 $m\mu$.

Análoga experiencia se repitió con la tripsina, determinando el espectro visible de una disolución de proteína y de hematina después de conservada en atmósfera aerobia. Los espectros obtenidos presentaron las bandas de absorción de los ferrihemocromos poco definidas.

Se comprobó espectrofotométricamente que la formación de los ferrohemocromos

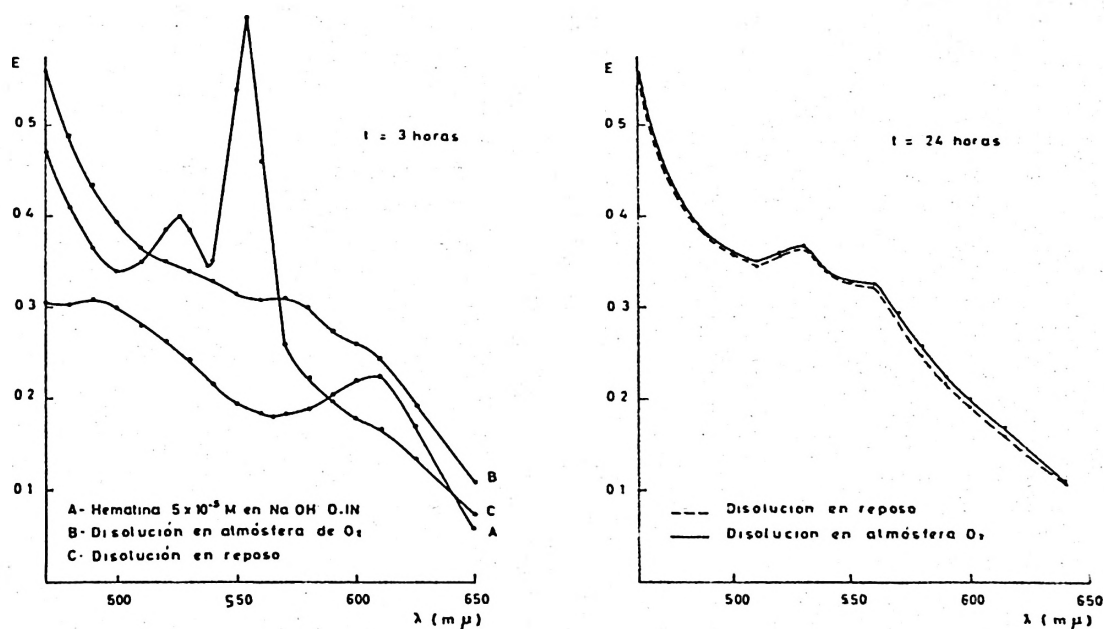


FIG. 3. Variación del espectro de absorción visible del ferrihemocromo de la α -quimotripsina. α -Quimotripsina $0,75 \times 10^{-3}$ M en NaOH 0,1 N. R_M P/H: 15/1.

se completaba ya a los primeros minutos de la reacción, es decir, hacia los cinco minutos después de iniciada. En condiciones anaerobias, el ferrohemocromo de la α -quimotripsina permanecía inalterado con el tiempo. En cambio, la extinción en los máximos exhibida por la correspondiente combinación de la protohema con la tripsina decrecía gradualmente, aun convenientemente protegida de la oxidación, y ni siquiera la adición de reductor — ditionito — detenía dicho decremento. De estos resultados se dedujo la conveniencia de efectuar las medidas transcurridos cinco

ella cómo la reacción transcurre con lentitud, a diferencia de lo que sucede con la combinación reducida (ferrohemocromo) que requiere tan sólo unos minutos.

El estudio cuantitativo de las combinaciones — reducidas u oxidadas — de las proteínas desnaturalizadas con la hematina, se efectuó teniendo en cuenta las peculiaridades hasta aquí descritas.

Los aumentos graduales de concentración proteica en las disoluciones alcalinas de hematina (hema) ocasionan incrementos progresivos de la densidad óptica medida en las longitudes de onda correspon-

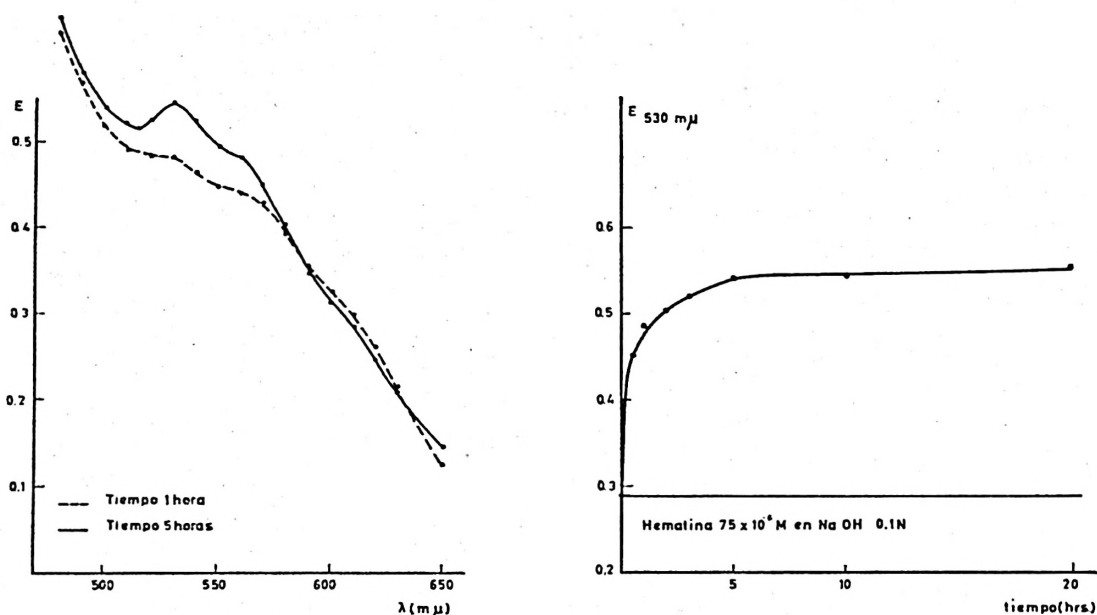


FIG. 4. Variación espectral con el tiempo, del ferrihemocromo de la α -quimotripsina en atmósfera de O_2 .

Hematina: 75×10^{-6} M. α -Quimotripsina: $1,12 \times 10^{-3}$ M.

minutos después de iniciadas las reacciones de formación.

El tiempo invertido en la formación del ferrihemocromo de la α -quimotripsina se registró mediante disoluciones mantenidas en ambiente aerobio; con el propósito de soslayar los efectos de la autorreducción citada anteriormente. En la figura 4 se muestra dicho intervalo. Se observa en

dientes a los máximos de absorción de los ferri- y ferrohemocromos.

La representación gráfica del conjunto de incrementos de la extinción de las distintas disoluciones respecto de la absorción de la hematina, medidos en las longitudes de onda de máxima absorción (ordenadas), frente a las diferentes relaciones molares de sus componentes (abscisas)

conduce a una curva compuesta por dos tramos lineales de distinta pendiente. La relación estequiométrica de los componentes en las combinaciones formadas se deduce proyectando en abscisas el punto de intersección determinado por la adecuada extrapolación de las porciones rectilíneas de ambas curvas.

La figura 5 ilustra sobre la composición del ferrohemocromo de la tripsina, según estudio efectuado en las tres longitudes de onda de máxima absorción de la combinación. Se aprecia la extrema concordancia hallada para los valores de la relación estequiométrica, deducidos gráficamente de cada una de las tres curvas. El resultado de una experiencia análoga realizada para el ferrihemocromo de la α -qui-

- A Banda α : 554 m μ conc. Hema: 25×10^{-6} M
 B Banda β : 526 m μ conc. Hema: 25×10^{-6} M
 C Banda Soret: 422 m μ conc. Hema: 5×10^{-6} M

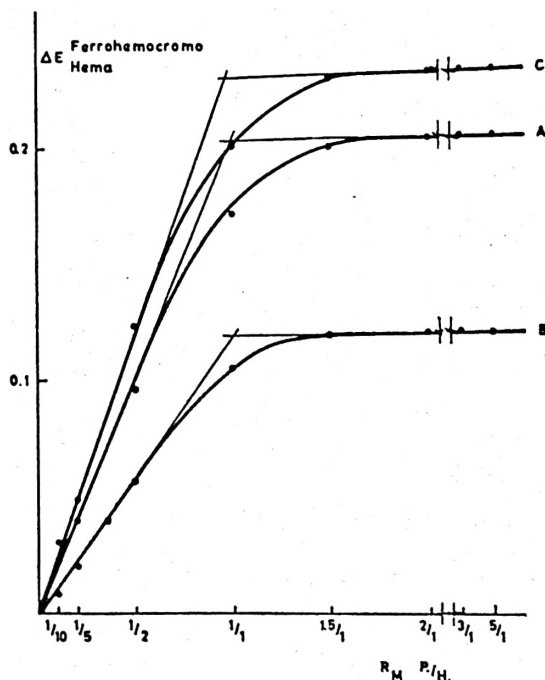


FIG. 5. Valoración espectrofotométrica del ferrohemocromo de la tripsina desnaturalizada por álcali.

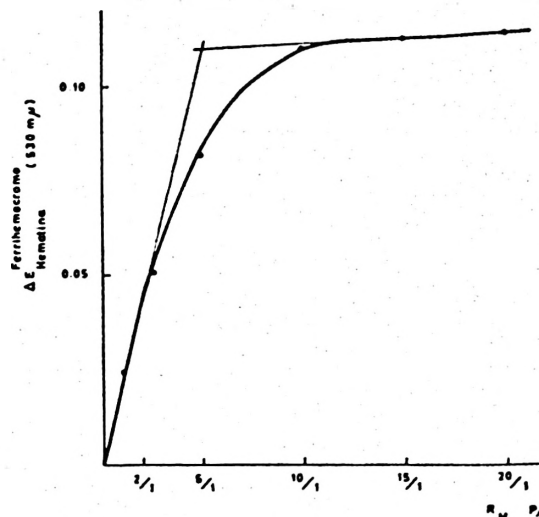


FIG. 6. Formación del ferrihemocromo de la α -quimotripsina álcali-desnaturalizada por adición de la proteína.
 Hematina: 75×10^{-6} M.

motripsina en su banda β ($\lambda = 530$ m μ) se exhibe en la figura 6. El valor de la relación estequiométrica Proteína/Hema hallado es sensiblemente igual a la unidad. El valor correspondiente para el ferrihemocromo de la α -quimotripsina es igual a 5/1.

Puesto que cada molécula de metaloporfirina se combina con dos grupos nitrogenados básicos de la proteína (5, 11), la saturación de ésta por pigmento implica un número de grupos formadores de hemocromo doble del de moléculas hematinicas.

Conocido el contenido en aminoácidos básicos de cada proteína, su comparación con el número de grupos que realmente intervienen en la combinación proporciona una medida de la afinidad de aquella por el pigmento — una vez desplegada por la álcali-desnaturalización — así como de la particular disponibilidad para la reacción de los grupos básicos presentes. En la tabla I se resumen el conjunto de resultados obtenidos con las combinaciones estudiadas.

Las medidas de la absorción de diso-

TABLA I

Contenido en aminoácidos básicos y grupos formadores de hemocromo hallados.

Aminoácidos moles/mol prot.	TRIPSINA	α -QUIMOTRIPSINA
Histidina	3	2
Arginina	2	4
Lisina	14	13
Total	19 ^a	19 ^b
R _E	Ferrihemocromina	1/1
	Ferrihemocromo	— ^c
Grupos amino- zantes por mol. prot.	Ferrihem.	2
	Ferrihem.	— ^c

a: Véase ref. n.º 8. b: R_E expresa la relación estequiométrica Proteína/Pigmento hallada. c: La limitada resolución de los espectros de absorción no permitió determinaciones cuantitativas.

luciones mezcla de protohema y de las proteínas a distintos pH, en la longitud de onda correspondiente a la banda α del ferrohemocromo alcalino, comparadas con las exhibidas por las de protohema pura, indican que por debajo de pH 8 no tienen lugar las combinaciones. A partir de pH 9, se inicia la formación progresiva de los ferrohemocromos, que alcanza su valor máximo al pH del NaOH 0,1 N. En la tabla II se reúnen los valores obtenidos expresados como múltiplos de la absorción a 554 m μ .

TABLA II

Influencia del pH en la afinidad de las proteínas por la Hema.

Construato	λ (m μ)	L, $\times 10^3$ en α a distintos pH						
		7	8	9	10	11	12	NaOH 0,1N
Hema	554	135	135	135	135	135	135	135
Tripsina-Hema	554	140	140	157	165	210	490	610
α -Quimotripsina-Hema	554	145	137	150	160	210	490	565

La caracterización electroforética de los ferrihemocromos objeto de estudio se basa en la distinta movilidad electrofrética que exhibe la protohematina pura respecto de sus combinaciones proteicas (17). En la formación de las combinaciones sometidas a examen se procuró que las relaciones molares Proteína/Hematina respondieran a concentraciones de pigmento superiores a la máxima capacidad de combinación de las proteínas desnaturalizadas. Esta circunstancia nos permitió distinguir claramente la hematina combinada (ferrihemocromo) de la fracción no reaccionada (libre).

Los electrogramas de la figura 7 muestran cómo los ferrihemocromos se desplazan en dirección al polo positivo (ánodo) —debido a su componente proteico—, contrastando con la inmovilidad del exceso de pigmento no combinado, y con el de

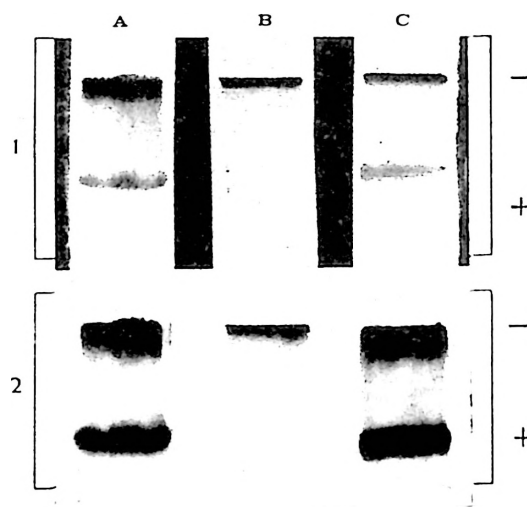


Fig. 7. Diagramas electroforéticos de hematina alcalina y de los ferrihemocromos de la tripsina y de la α -quimotripsina.

Electrograma n.º 1: Fotografía con luz UV. Tiras sin revelar.

Electrograma n.º 2: Tiras electroforéticas reveladas con bencidina.

A = Ferrihemocromo de la tripsina. B = Hematina alcalina. C = Ferrihemocromo de la α -quimotripsina.

la tira de referencia, que contenía el testigo de hematina pura.

Discusión

La tripsina y la γ -quimotripsina alcali-desnaturalizadas se combinan con la hematina — forma oxidada y reducida — produciendo los correspondientes ferrihemocromos y ferrohemocromos: se considera que el previo tratamiento por hidróxido sódico provoca el desplegamiento estructural de sus moléculas proteicas, indispensable para la asequibilidad reactiva de algunos grupos nitrogenados básicos hema-enlazantes (tabla II).

La formación de los ferrihemocromos es mucho más lenta — requiere horas — que la de los ferrohemocromos — pocos minutos —, constituyendo una característica genuina de aquellos compuestos oxidados (2); el fenómeno pudo interpretarse como consecuencia de una competencia por la porfirina establecida entre el agua y los grupos proteicos de enlace, la cual provoca una disminución de la afinidad de la proteína por el pigmento. La reacción de combinación con los hidroxiliones es privativa de la ferriporfirina y no tiene lugar con su forma reducida la ferroporfirina.

Los valores obtenidos para las relaciones molares Proteína/Pigmento de los hemocromos estudiados (tabla I) ponen de manifiesto que el grado de saturación del componente proteico por moléculas de metaloporfirina es mayor en el caso de los ferrohemocromos. Estos resultados subrayan la significación de la competencia mencionada entre las moléculas de agua y los grupos de enlace proteicos, responsables de la clara disminución de la capacidad de combinación de la proteína con la ferriporfirina. Cuanto menor sea la disponibilidad de grupos básicos, bien por su escaso contenido, bien por hallarse estéricamente poco accesibles, mayor será el número de hidroxilos que se unirán al hierro hematínico y, por tanto, la proteína desnaturalizada se coordinará con un nú-

mero menor de moléculas de protohematina.

El ferrohemocromo de la tripsina se caracteriza por cierta inestabilidad atribuible a la gran sensibilidad de la proteína a la desnaturalización alcalina que, además de hacer accesibles a los grupos básicos de enlace, puede también provocar alteraciones progresivas de sus afinidades. Con el ferrohemocromo de la histidina se observó una circunstancia similar (13) aunque no creemos que la interpretación que se propuso pueda generalizarse al caso nuestro de la tripsina.

La deficiente resolución espectral observada del ferrihemocromo de la tripsina — que no nos ha permitido hacer su estudio cuantitativo — sugiere la existencia de una considerable disociación de la combinación, similarmente a lo observado con otros compuestos análogos (15), aparte de la ya mencionada sensibilidad a los álcalis de la molécula proteica del enzima.

Una inspección comparativa de los resultados consignados en la tabla I sugieren la imposibilidad de que sea la histidina el grupo hema-enlazante exclusivo, en la formación de los hemocromos: parece fuera de duda que existan otros grupos básicos pertenecientes a distintos aminoácidos, cointerventores directos en las combinaciones. En el caso de la tripsina, dada su sensibilidad a los álcalis, la formación de hemocromos debe depender de otros factores tales como la peculiar configuración estérica de los grupos hema-enlazantes potenciales. Compárese con observaciones anteriores relacionadas con diversos factores (18, 21).

La autorreducción de los compuestos oxidados observada cuando se intenta preparar ferrihemocromos operando en presencia de elevadas concentraciones molares de las proteínas que nos ocupan, es objeto de estudio en un trabajo posterior, en el que se hace patente el papel desempeñado por los grupos —SH proteicos en la reducción conducente a los ferrohemocromos.

Resumen

La α -quimotripsina y la tripsina álcali-desnaturalizadas reaccionan con la ferriprotoporfirina IX en medio alcalino con formación de ferri- y ferrohemocromos.

La afinidad de estos enzimas desnaturalizados por la protohematina es mayor en el caso de las combinaciones con la forma reducida del pigmento. El número de grupos proteicos enlazantes hallados es superior al de los restos de histidina contenidos por las respectivas proteínas.

Ninguna de ambas proteínas se combina con la protohema a pH neutro. La reacción de combinación resulta directamente favorecida por el aumento de la basicidad del medio que evidencia el requerimiento de una previa desnaturalización proteica.

Se incluye una caracterización complementaria de los ferrihemocromos mediante electroforesis sobre soporte de membrana de acetato de celulosa, que confirma cualitativamente las afinidades por la hematina de las proteínas estudiadas.

Summary

Coordination of α -chymotrypsin and Trypsin with Hematin. I. Obtention and Properties of Hemochromes

Alkali denatured α -chymotrypsin and trypsin react with ferriprotoporphyrin IX in alkaline media and readily form the corresponding ferri- and ferrohaemochromes.

The affinities for protohaematin of both denatured enzymes are stronger towards the reduced form of the pigment. The number of haem-binding groups of the proteins appears to be higher than the histidine rests contained in their molecules.

The velocity of the reaction of combination with haem increases with pH, as a previous alkali-denaturation of the proteins is required; at pH 7 no combination takes place.

The stabilities of the corresponding ferrihaemochromes of α -chymotrypsin and trypsin have been duly confirmed by zone electrophoresis carried on cellulose acetate strips.

Bibliografía

1. ANSON, M. L., y MIRSKY, A. E.: *J. Physiol.*, 60, 50, 1925.
2. CORWIN, A. H., y REYES, Z.: *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 2437, 1956.
3. CORYELL, C. D., y PAULING, L.: *J. Biol. Chem.*, 132, 769, 1940.
4. Enzyme Nomenclature: Ed. Elsevier, Londres. p. 19. 1965.
5. FALK, J. E.: En *Porphyryns & Metalloporphyrins*. Ed. Elsevier, Londres. p. 181. 1964.
6. FISCHER, H.: *Org. Syn.*, 3, 442, 1955.
7. FRANKLIN, A. E., y QUASTEL, J. H.: *Science*, 110, 447, 1949.
8. GREEN, N. M., y NEURATH, H.: En *The proteins*. Eds. H. Neurath y K. Bailey. Ed. Academic Press, Nueva York. Vol. 2, 1057, 1954.
9. GREEN, N. M., y NEURATH, H.: *J. Biol. Chem.*, 204, 379, 1953.
10. HAUROWITZ, F.: *Hoppe-Seyl. Z.*, 232, 146, 1935.
11. HILL, R.: *Proc. Roy. Soc. (Londres)*. Ser. B, 100, 429, 1926.
12. HIRSCH, M.: *Doctoral Dissertation*, Heidelberg. 1934.
13. KAJITA, A., UCHIMURA, F., MIZUTANI, H., KIKUCHI, G., y KAZIRO, K.: *J. Biochem. (Tokio)*, 46, 593, 1959.
14. KAZIRO, K., y TSUSHIMA, K.: En *Haematin Enzymes*. Eds. J. E. Falk, R. Lemberg y R. K. Morton. Ed. Pergamon Press, Londres, p. 80, 1961.
15. KEILIN, D.: *Proc. Roy. Soc. (Londres)*, Ser. B, 100, 129, 1926.
16. KEILIN, J.: *Dissertation*. Cambridge, 1951.
17. LACAZ, P. S., SALAC, M. L. B., y SALUM, J.: *J. Brasil. Med.*, 1, 1347, 1959.
18. LEMBERG, R., y LEGGE, J. W.: En *Haematin Compounds and Bile Pigments*. Ed. Interscience. Nueva York, 1949.
19. O'HAGAN, J. E.: *Nature*, 183, 393, 1959.
20. O'HAGAN, J. E.: *Biochem. J.*, 74, 417, 1960.
21. ROSENBERG, L. L., y CLARK, W. M.: *J. Biol. Chem.*, 205, 617, 1953.
22. SMILLIE, L. B., y KAY, C. M.: *J. Biol. Chem.*, 236, 112, 1961.
23. WYMAN, J.: En *Advances in Protein Chemistry*. Ed. Academic Press. Nueva York. Vol. 4, 407, 1948.