

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Barcelona

## Coordinación de la $\alpha$ -quimotripsina y de la tripsina con la hematina. II. Producción de ferrohemocromos por la acción reductora de la proteína desnaturalizada sobre el hierro hematínico

por

L. Cornudella y F. Calvet

(Recibido para publicar el 14 de mayo de 1968)

En un trabajo anterior (3) se hace referencia a la reducción que experimenta la ferritoporfirina IX en disolución alcalina cuando hay presentes elevadas concentraciones molares de tripsina o de  $\alpha$ -quimotripsina, así como a la influencia ejercida sobre el fenómeno por parte de diversos factores, tales como el tiempo de desnaturalización alcalina de las proteínas y la ausencia o presencia de oxígeno disuelto en el medio.

Alteraciones similares a las observadas han sido previamente descritas para combinaciones de la ferrohema «a» con ciertos ligandos nitrogenados. LEMBERG (10) publicó que la hema «a» disuelta en piridina anhidra, sin adición de reductor alguno, conducía a la formación del ferrohemocromo, en vez del compuesto oxidado. Otros autores han confirmado dicho fenómeno y su reversibilidad sometiendo al vacío disoluciones del hemocromo «a» piridínico parcialmente oxidado (2). También han sido objeto de estudio características similares exhibidas por otras formilheminas combinadas (12).

Las variaciones espectrales experimentadas por la hema «a» y sus combinaciones — tanto en la región del visible como en la del UV cercano —, han merecido una particular atención (4, 11, 20), extensiva a varios de sus complejos con proteínas (9). VANDERKOOI y STOTZ han estudiado detenidamente las alteraciones inducidas por el ditionito sódico en los hemocromos de la hema «a», llegando a establecer dos formas para su ferrohemocromo imidazólico (18, 19).

Todas las modificaciones observadas se han atribuido al propio pigmento, sugiriéndose que la reducción del grupo formilo de la molécula porfirínica por el ditionito era la causante de las variaciones espectrales observadas en las combinaciones de la hema «a».

En el caso que nos ocupa — reducción de los ferrihemocromos de la  $\alpha$ -quimotripsina y de la tripsina — no cabe suponer la intervención de la propia ferritoporfirina en la motivación del fenómeno, puesto que sometida aisladamente la sustancia a la metódica de los ensayos, no

experimenta variación sensible alguna. En consecuencia, parecía lógico considerar al componente proteico de la combinación como a la causa probable de la reducción observada.

En este trabajo se pretende aportar la evidencia experimental sugerente de que la formación de ferrohemocromos de la tripsina y de la  $\alpha$ -quimotripsina — sin adición de sustancia reductora alguna — se provoca por la acción de grupos liberados progresivamente en la propia molécula proteica, por la desnaturalización alcalina que experimenta. Este estudio se ha hecho extensivo a la ovoalbúmina con el propósito de generalizar la significación de los resultados.

### Material y métodos

Las técnicas de experimentación utilizadas en la mayoría de los casos, así como los reactivos, fueron los mismos ya descritos con anterioridad (3). La ovoalbúmina utilizada en algunos de los ensayos fue adquirida a General Biochemicals, y era de calidad pura, dos veces recristalizada y exenta de sales.

Para la determinación de grupos sulfhidrilo se eligió como agente organometálico, formador de mercapturos, el nitrato de metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{HgNO}_3$ ). Este reactivo presenta ciertas ventajas que determinaron su elección. Es monofuncional, por lo que se evitan posibles efectos secundarios debidos a otros grupos de su molécula. Es estable y soluble en agua. Su reacción con los grupos -SH en medio alcalino es rápida y estequiométrica (6). Esta última característica nos permitió valorar con facilidad los grupos sulfhidrilo libres de las proteínas desnaturalizadas en estudio, reproduciendo las mismas condiciones ambientales y de pH en las que se provocaban las reducciones a ferrohemocromos de las combinaciones proteína-hematina.

El  $\text{CH}_3\text{HgNO}_3$  se preparó por el procedimiento de HUGHES (6) haciendo reac-

cionar  $\text{CH}_3\text{I}$  con mercurio metálico. Al  $\text{CH}_3\text{HgI}$  resultante, disuelto en alcohol etílico abs., se le añade  $\text{AgNO}_3$  para precipitar  $\text{AgI}$ , y el nitrato de metilmercurio se recristaliza en metanol. Las disoluciones del reactivo se valoran mediante un compuesto sulfhidrilo puro.

Los grupos -SH presentes o liberados en la desnaturalización alcalina progresiva de las proteínas se determinaron por valoración volumétrica con nitrato de metilmercurio, utilizando nitroprusiato sódico como indicador. Un volumen medido de disolución de la proteína en  $\text{NaOH}$  0,5 N recién preparada, que contenga de 1 a  $3 \times 10^{-3}$  moles de -SH, se completa hasta 4 ml con disolución de hidróxido sódico 0,1 N. Rápidamente se desplaza el aire del interior de los tubos mediante una corriente de nitrógeno. Se añaden 1-2 gotas de disolución de nitroprusiato sódico al 5 % (p/v) en agua destilada y después de agitar brevemente se practica la volumetría con disolución de  $\text{CH}_3\text{HgNO}_3$   $1 \times 10^{-3}$  M hasta viraje del color rojo-púrpura del indicador al amarillo-pajizo. Por ser equimolecular la reacción, el volumen consumido de reactivo proporciona directamente el número de sulfhidrilos libres, presentes en la disolución. La desviación observada entre los distintos valores obtenidos no excede del  $\pm 5$  % de la media aritmética, coincidiendo con la comúnmente aceptada (8).

### Resultados

La figura 1 muestra el espectro de absorción visible de una disolución alcalina de hematina y de  $\alpha$ -quimotripsina con una relación molar ( $R_{31}$ ) proteína/hematina igual a 15/1, obtenido después de transcurrida una hora de preparada la mezcla. La combinación proteína-metaloporfirina formada exhibe claramente las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  típicas del ferrohemocromo localizadas a 554 y 526  $m\mu$  respectivamente, mientras que la disolución testigo de protohematina alcalina presenta su espectro

original intransformado. Este hecho fue el que nos llevó a suponer que la reducción del  $Fe^{+++}$  pudiera ser provocada por la liberación progresiva de grupos reductores en la propia proteína, durante su desnaturalización alcalina, induciéndonos a estudiar cuidadosamente las condiciones del mismo y los efectos introducidos por su variación.

de mayor absorción, exhibidas por una disolución similar a la anterior, son más elevadas en los casos en que se ha operado en condiciones anaerobias, siendo entonces máxima la formación del ferro-hemocromo.

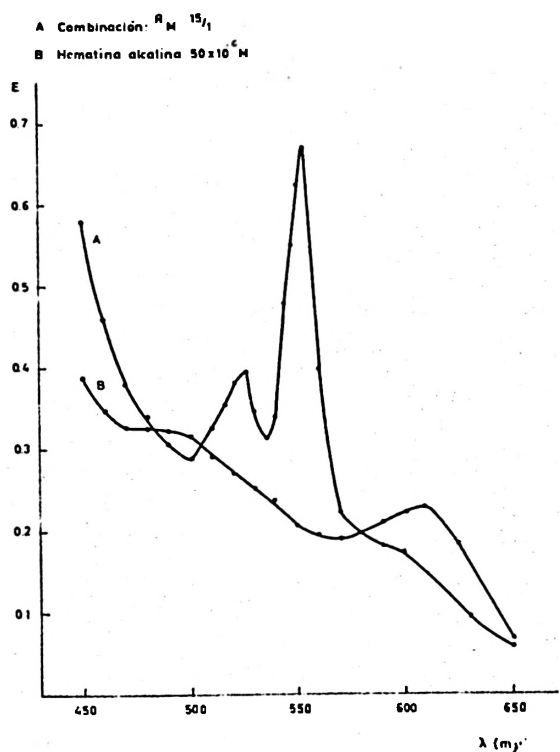
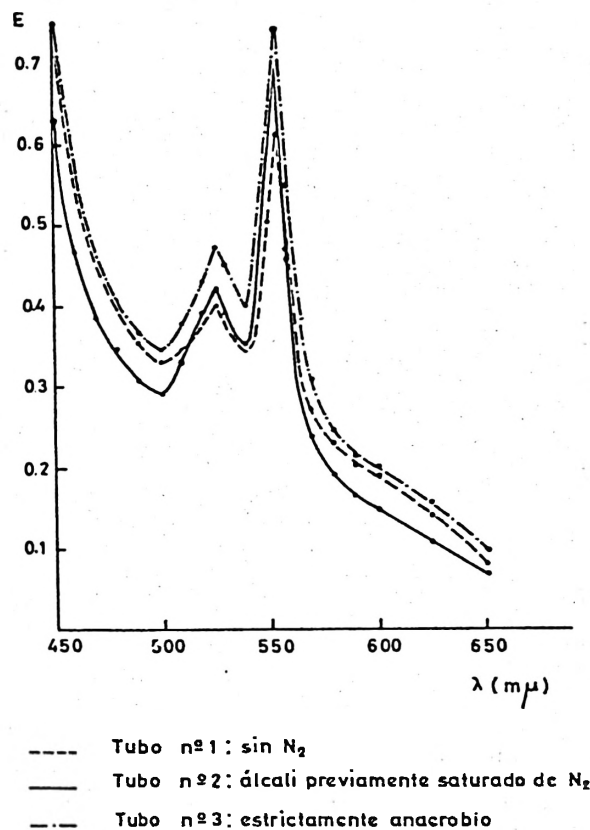


FIG. 1. Espectro visible de absorción de la combinación alcalina hematina- $\alpha$ -quimotripsina

Con objeto de precisar la influencia de la acción tanto del oxígeno disuelto en los líquidos, como del atmosférico, se procedió a operar en condiciones estrictamente anaerobias. Posteriormente se estableció el tiempo necesario para completarse el proceso, así como su persistencia y la estabilidad del complejo formado. Los espectros que aparecen en la figura 2 muestran como las extinciones, en las bandas



$\lambda$ ( $m \mu$ )	Tubo nº1	Tubo nº2	Tubo nº3
$\alpha=554$	0.610	0.690	0.740
$\beta=526$	0.400	0.415	0.470

FIG. 2. Espectro de absorción de la combinación  $\alpha$ -quimotripsina-hematina a las tres horas, en distintas condiciones de ambiente. Hematina:  $5 \times 10^{-5} M$ .  $R_M \alpha$ -Quimotripsina/Hematina = 15/1

En las figuras 3 y 4 se muestran las variaciones espectrales experimentadas con el tiempo por una disolución que contenía hematina y  $\alpha$ -quimotripsina con una  $R_M$  igual a 15/1, sin proteger de la oxidación por corriente de  $N_2$ .

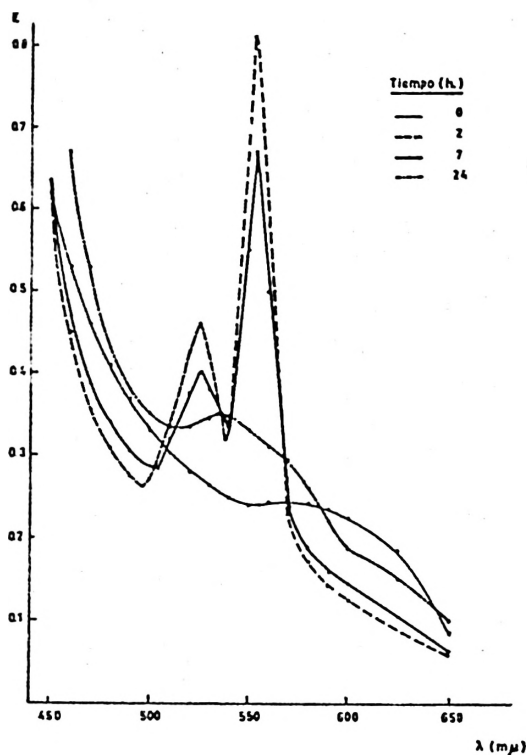


FIG. 3. Variación espectral con el tiempo de la combinación  $\alpha$ -quimotripsina-hematina en medio aerobio

Se observa primeramente cómo el espectro se va modificando al transcurrir del tiempo, tendiendo a intensificarse la extinción en las bandas de máxima absorción del ferrohemocromo; posteriormente, debido a la presencia del oxígeno atmosférico, se retransforma gradualmente en el correspondiente ferrihemocromo. Una parte alícuota de la anterior disolución mantenida en ambiente anaerobio, experimenta análogas modificaciones progresi-

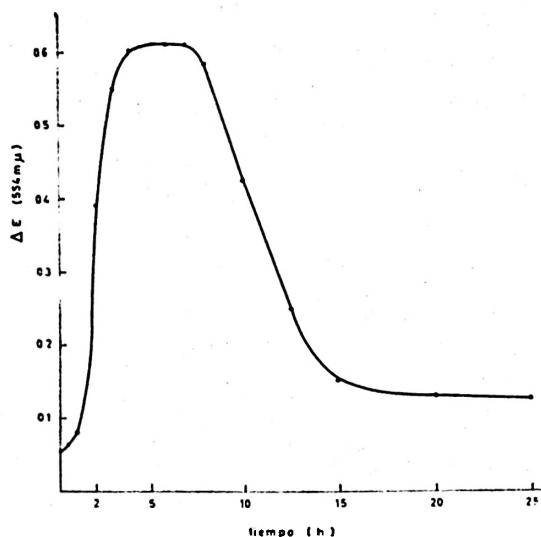


FIG. 4. Incremento de absorción con el tiempo a  $554 \text{ m}\mu$  de la combinación  $\alpha$ -quimotripsina-hematina sobre la de hematina

vas en su espectro de ferrohemocromo típico, debido a hallarse convenientemente protegida de oxidaciones, sus características espectrales permanecen inalteradas con el tiempo (fig. 5). Una ulterior comparación de este ferrohemocromo obtenido en ausencia de reductor adicionado, con el resultante por adición de ditionito a la disolución, evidenció que la reducción del hierro era prácticamente equiparable en ambos casos.

Una vez fijadas las condiciones por las que el hierro hemático se reduce y se mantiene en dicho estado, se procedió a investigar directamente la intervención de la proteína en el proceso. El fundamento de la experiencia consistió en medir las absorciones en la longitud de onda correspondiente a la banda  $\alpha$  del ferrohemocromo ( $554 \text{ m}\mu$ ), presentadas por varias disoluciones de hematina-proteína que contenían  $\alpha$ -quimotripsina en concentraciones crecientes. Una vez preparadas las mezclas se hacía circular por ellas una corriente de  $N_2$  durante 30 minutos y se mantenían así — en ambiente anaero-

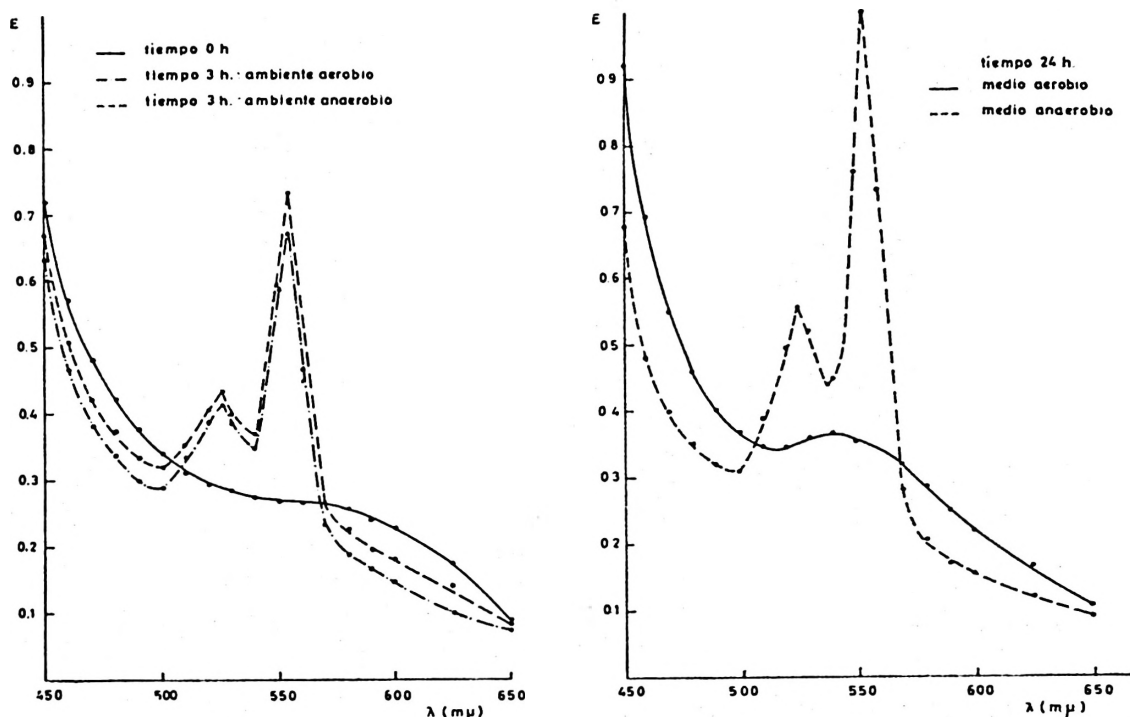


FIG. 5. Variación con el tiempo del espectro visible de absorción de la combinación  $\alpha$ -quimotripsina-hematina en medio anaerobio

bió —, hasta el instante de su medición espectrofotométrica. Habiéndose observado en las experiencias anteriores que el espectro típico de ferrohemocromo, obtenido de la combinación proteína-hematina conservada en condiciones anaerobias, se mantenía durante intervalos considerables de tiempo, las lecturas se practicaron 20 horas después de la adición de protohematina a las disoluciones proteicas. La experiencia se reprodujo parcialmente en ambiente aerobio, es decir, sin saturar de  $N_2$  las disoluciones finales, ni conservarlas en atmósfera del gas. La absorción de estas disoluciones se determinó a las 3 horas de preparadas.

En la gráfica de la figura 6 se exhiben las extinciones resultantes, expresadas como incremento ( $\Delta E$ ) respecto de la absorción de la protohematina alcalina a 554  $\mu$ m, en función de las relaciones mo-

lares proteína/hematina que las definen.

Para relaciones molares inferiores a 10/1, el incremento de extinción hallado se observa que experimenta una variación considerable. A partir de esta  $R_M$  la variación tiende a estabilizarse en un valor fijo. El punto de intersección de las prolongaciones rectilíneas de la curva, proyectado sobre el eje de abscisas, proporciona un valor para la  $R_M = 7/1$ . La curva debida a la experiencia realizada en ambiente aerobio posee la misma pendiente que la anterior, aunque su resultante viene establecida por unos valores de  $\Delta E$  menores que en el otro caso, y a su vez el punto de intersección de las prolongaciones rectas de la curva coincide con una  $R_M$  mayor; e igual sucede con la  $R_M$  a partir de la cual los valores de los  $\Delta E$  son constantes.

El hecho de que los valores de  $\Delta E$  sean

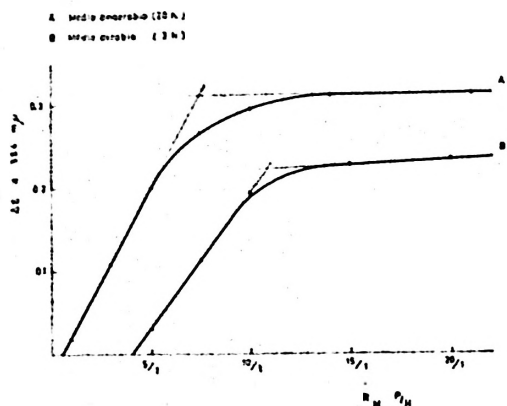


FIG. 6. Influencia de la  $\alpha$ -quimotripsina en la reducción de su combinación con la hematina. Hematina:  $5 \times 10^{-5}$  M

menores en la curva del ensayo en ambiente aerobio indica que en este caso, el grado de reducción del hierro es inferior. Por otra parte, el desplazamiento de la misma curva hacia  $R_M$  superiores muestra que, para conseguir efectos parecidos, se requieren mayores concentraciones de proteína. El fenómeno puede explicarse por la oxidación, debida al oxígeno atmosférico, de parte de los grupos reductores liberados de la proteína, por cuyo motivo las  $R_M$  que definen los puntos en la curva son valores aparentes.

Las experiencias efectuadas con tripsina y ovoalbúmina, similares a las descritas para la  $\alpha$ -quimotripsina, condujeron a resultados análogos.

La figura 7 ilustra acerca de la combinación entre la protohematina y la tripsina en medio alcalino, apreciándose que las disoluciones de ambas de  $R_M$  igual a 30/1, no protegidas de la oxidación, a las pocas horas de preparadas presentan el espectro de ferrohemocromo, el cual desaparece completamente a las 24 horas, resultando substituido por el de la combinación oxidada —de trazado poco definido— como ya se ha indicado previamente (3).

Una disolución de los anteriores componentes de  $R_M = 10/1$  mantenida en atmósfera inerte, poco antes de las dos horas presenta la absorción típica de las combinaciones reducidas. Este espectro persiste a las 24 horas, aunque los valores de la extinción resultan algo inferiores a los del ferrohemocromo obtenido por reducción con ditionito.

En el caso de la ovoalbúmina, la reducción al correspondiente ferrohemocromo inducida por un exceso de la proteína, tiene lugar con unas características algo distintas. Las disoluciones alcalinas de ovoalbúmina y de hematina de  $R_M$  igual a 30/1, mantenidas en ambiente aerobio, exhiben directamente el correspondiente espectro de ferrihemocromo, sin ulteriores transformaciones (ausencia de reduc-

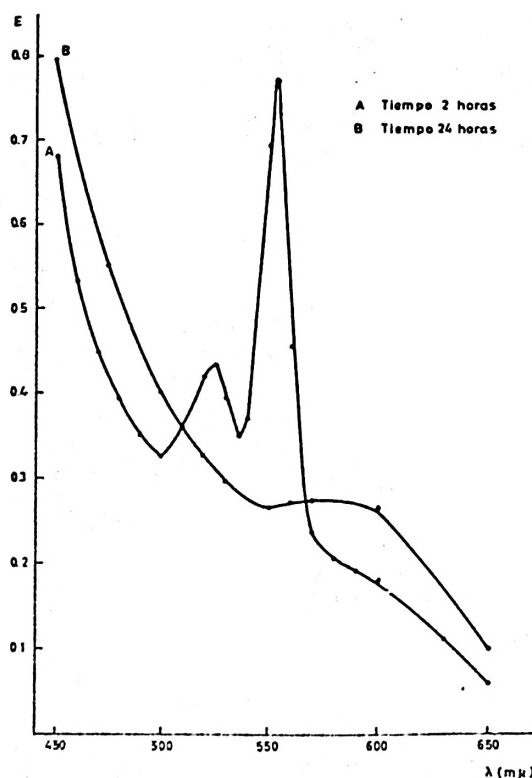


FIG. 7. Variación espectral con el tiempo de la combinación tripsina-hematina en medio aerobio,  $R_M$  Tripsina/Hematina = 30/1

ción). En cambio, si las mismas disoluciones se mantienen en atmósfera de nitrógeno, entonces tiene lugar la aparición de los máximos de absorción característicos de los ferrohemocromos, si bien no se hacen patentes hasta después de transcurridos intervalos del orden de las 20 horas (fig. 8). A tiempos más cortos sólo se aprecia un desplazamiento de la banda  $\beta$  del ferrihemocromo ( $540 \text{ m}\mu$ ) hacia longitudes de onda superiores ( $550 \text{ m}\mu$ ), pero sin que se modifique sensiblemente el valor de la extinción.

En disoluciones de relación molar más pequeña no se observan variaciones del espectro del ferrihemocromo. Para ello es necesario mantenerlas en atmósfera inerte y aun así no se acusan modificaciones espectrales hasta pasadas más de 24 horas.

Parece innecesario indicar que todas las alteraciones reductivas descritas no tienen lugar si las disoluciones de NaOH 0,1 N utilizadas han sido previamente saturadas de oxígeno.

Comprobada la intervención directa de la proteína en la reducción al ferrohemocromo de su combinación con la protohematina, se procedió a investigar su capacidad reductora, con el propósito de establecer el mecanismo primario directamente responsable.

Parece fuera de duda que la acción reductora de la proteína deba relacionarse con la mayor o menor reactividad de sus grupos reductores. Las modificaciones experimentadas por las moléculas de las proteínas sometidas a las condiciones de desnaturalización alcalina — ambiente y tiempo — utilizadas en las anteriores experiencias, se verificaron observando el comportamiento de sus grupos reductores, concretamente los sulfhidrilo, por ser los de mayor significación.

Ahora bien, la disponibilidad reactiva de los grupos sulfhidrilo depende de la configuración específica de cada molécula proteica, nativa o desnaturalizada. A su vez, los efectos de la reducción son direc-

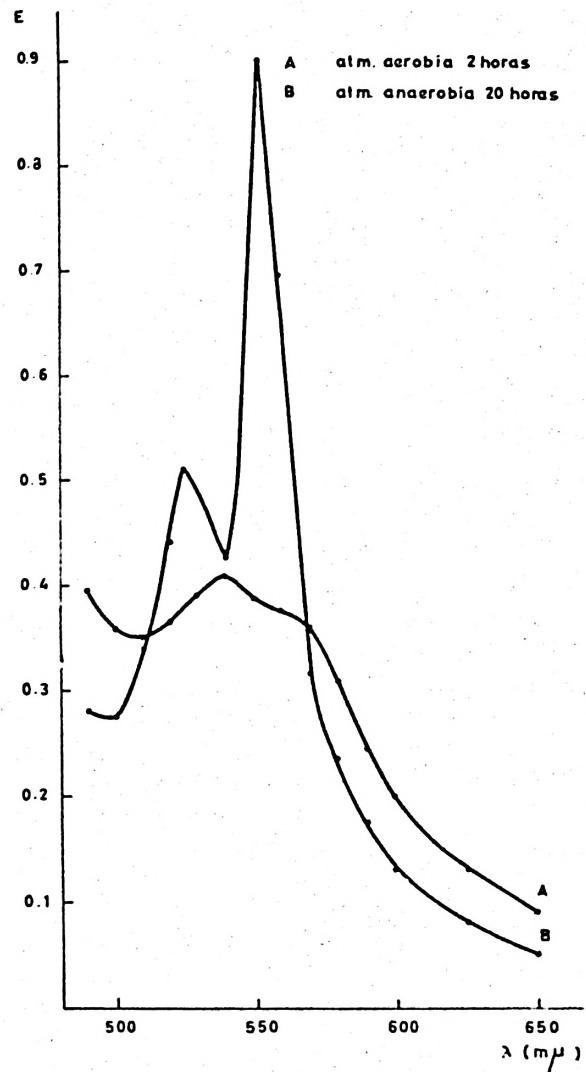


FIG. 8. Alteración del espectro de absorción de la combinación ovoalbúmina-hematina en distintas condiciones de ambiente.  $R_M$  Ovoalbúmina/Hematina = 30/1

tamente proporcionales al contenido en -SH, disponible o total.

En el caso particular de las proteínas nativas estudiadas, sus contenidos en cisteínas son pequeños o nulos, como se muestra en la tabla I, y por tanto no permitirían explicar las acciones reductoras observadas.

TABLA I  
Contenido en aminoácidos sulfurados.

AMINOACIDOS/MOL DE PROTEINA			
Aminoácido	$\alpha$ -Quimotripsina (5)	Tripsina (1)	Ovoalbúmina (14)
Cistina/2	10	6	2
Cisteína	0	0	5

En este punto, y dada la desnaturalización experimentada por la proteína en medio alcalino, hay que tener en cuenta que también intervienen — aunque indirectamente — los puentes disulfuro cistínicos, que al romperse pasan a incrementar el contenido global en grupos reductores.

La alteración por álcalis experimentada por el puente disulfuro de la cistina con formación de sulfuro, fue estudiada por SPEAKMAN (16), habiéndose propuesto diversos mecanismos para explicar la degradación alcalina experimentada por el aminoácido (7, 13, 15, 17).

Es evidente que el intercambio tiol-disulfuro juega un papel prominente en las interacciones proteínicas, beneficiando el contenido en residuos o grupos reductores; estos hechos apoyan la verosimilitud de la concepción aducida respecto a la reducción del hierro hematóxico observa-

da en sus combinaciones con las proteínas desnaturalizadas objeto de este estudio.

En consecuencia, se procedió a determinar el contenido en -SH de la  $\alpha$ -quimotripsina, de la tripsina y de la ovoalbúmina, una vez desnaturalizadas por el álcali. Las disoluciones alcalinas de las proteínas recién preparadas se conservaron en atmósfera inerte y en la cámara a +4° C. Las valoraciones se espaciaron a distintos intervalos de tiempo, considerándose como tiempo 0 las determinaciones practicadas inmediatamente después de preparadas las disoluciones. Con finalidades comparativas, se abandonaron expuestas al aire sendas porciones alicuotas de las disoluciones iniciales. En la tabla II se recogen los resultados obtenidos.

Las tres proteínas recién disueltas carecen prácticamente de grupos sulfhidrilo reconocibles con el  $\text{CH}_3\text{HgNO}_3$ . A medida que progresa la desnaturalización por el álcali, van apareciendo varios grupos reductores, originalmente *enmascarados*. En la tripsina y la  $\alpha$ -quimotripsina se observa el mayor contenido en grupos -SH a las 24 horas, si las disoluciones se han mantenido protegidas de la oxidación. La ovoalbúmina, en cambio, parece resultar menos afectada por la desnaturalización alcalina. En las determinaciones practicadas con muestras abandonadas al aire durante largo tiempo, se observó la total desaparición de sus grupos -SH.

TABLA II  
Determinación de grupos sulfhidrilo en las proteínas

Tiempo (horas)	GRUPOS -SH/MOL DE PROTEINA					
	$\alpha$ -Quimotripsina		Tripsina		Ovoalbúmina	
	atm. O <sub>2</sub>	atm. N <sub>2</sub>	atm. O <sub>2</sub>	atm. N <sub>2</sub>	atm. O <sub>2</sub>	atm. N <sub>2</sub>
0	0,04		0,05		0	
24	1,67	3,8	1,76	4,3	0,8	1,3



En el entendido de que la alteración de los puentes disulfuro (cistínicos) conduce por el tratamiento alcalino a la formación de sulfuros (16), se procedió a obtener los ferrohemocromos de las proteínas por reducción con  $\text{Na}_2\text{S}$ , utilizando concentraciones del reactivo equivalentes al número de grupos  $-\text{SH}$  presentes en las mezclas proteína-hematina ensayadas.

Las condiciones de las experiencias se establecieron atendiendo a la relación molar  $\text{S}^-/\text{hematina}$  deducida de las siguientes observaciones: *a*) el exceso de proteína adecuado para conseguir una óptima reducción a ferrohemocromo (i.e.,  $R_M = 30/1$ ). *b*) el contenido en grupos  $-\text{SH}$  (tabla II) correspondiente a la concentración de proteína presente en la disolución al practicar su reacción de combinación con la hematina.

Las concentraciones de las respectivas proteínas y de la hematina de las disoluciones a tratar por  $\text{Na}_2\text{S}$ , se puntualizaron de manera que decidiesen una relación molar común en los tres casos, coincidente con la  $R_M$  estequiométrica hallada en la composición de los ferrohemocromos (3), o bien, significara un pequeño exceso ( $R_M = 1/1$ ). En todo caso, dicha relación garantizaba una concentración de proteína muy inferior a la necesaria para inducir por sí misma el proceso de la autorreducción antes descrito. La adición del reductor ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) a las disoluciones contenidas en las cubetas espectrofotométricas de medida se realizó con técnica análoga a la utilizada para las reducciones con ditionito (3). Paralelamente se leyeron también las extinciones obtenidas por tratamiento con este último reactivo.

En la tabla III se consignan las extinciones leídas en las bandas  $\alpha$  ( $554 \text{ m}\mu$ ) y  $\beta$  ( $526 \text{ m}\mu$ ) para las distintas combinaciones. De ella se deduce que la acción del  $\text{Na}_2\text{S}$  provoca, en los casos de la  $\alpha$ -quimotripsina y de la tripsina, la formación de ferrohemocromo, aunque la

reducción no es tan completa como reduciendo con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ .

La acción reductora del sulfuro no es apreciable en la combinación con la ovoalbúmina, pues en este caso se obtiene el ferrihemocromo. El hecho de que en la longitud de onda correspondiente a la banda  $\alpha$  se observe una absorción algo menor que en la banda  $\beta$ , es característica del espectro de los ferrihemocromos.

TABLA III

Estudio comparativo de la reducción por cantidades equivalentes de  $\text{Na}_2\text{S}$ .

Reductor	$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$		$\text{S}^-$	
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$
$\alpha$ -Quimotripsina . . . . .	1,0	0,52	0,52	0,395
Tripsina . . . . .	0,76	0,45	0,42	0,35
Ovoalbúmina . . . . .	0,94	0,52	0,28	0,305

### Discusión

En el presente trabajo se describe la alteración reductiva que tiene lugar al coordinar la  $\alpha$ -quimotripsina, la tripsina y la ovoalbúmina desnaturalizadas, con la protohematina ( $\text{Fe}^{+++}$ ) — sin adición de sustancia reductora alguna —, cuando la concentración molar de la proteína presente en la disolución es considerablemente superior a la del pigmento, lo que conduce a la formación del ferrohemocromo, en vez del correspondiente ferrihemocromo.

No parece probable que la hematina intervenga en la motivación del fenómeno descrito, dado que acusa alteración alguna si se la somete aisladamente a las mismas condiciones de los experimentos realizados. Es plausible, por lo tanto, considerar al componente proteico del compuesto como a la causa probable de las reducciones automáticas observadas. Ade-

más, si se tiene en cuenta que dichas reducciones no son instantáneas, sino que van aumentando paulatinamente con el tiempo, se sugirió la existencia de una íntima conexión con la progresiva desnaturalización alcalina que experimenta la molécula proteica.

Los hechos observados permiten admitir como probable que, al irse desnaturalizando la proteína, simultáneamente con la exposición de los grupos básicos implicados en los enlaces con la metaloporfirina, también se tornen estéricamente accesibles otros grupos dotados de propiedades reductoras, que cuando están convenientemente protegidos de la oxidación por un ambiente inerte (nitrógeno), deben ser los responsables de la reducción del hierro hematógeno. En condiciones aerobias, sin embargo, no se provoca la formación de ferrohemocromos.

La lentitud con que progresa el fenómeno observado sugiere se trate de un proceso inducido por la propia degradación íntima de la molécula proteica, caracterizada por una complejidad mayor que la simple de la liberación de grupos básicos hema-enlazantes.

A pesar de que, en ciertas condiciones y particularmente en el caso de la  $\alpha$ -quimotripsina, la alteración observada es equiparable a la potente reducción provocada por el ditionito, es difícil precisar en cada caso y momento, el grado de reducción automática experimentada por las distintas combinaciones. En efecto, los trazados de los respectivos espectros acusan una superposición de valores en las extinciones leídas, debida a la copresencia en la disolución de las dos especies, el ferrohemocromo recién formado y el ferrihemocromo remanente.

Por otra parte, la determinación de los excesos de proteína responsables de los máximos efectos de reducción evidencian que la proporción de grupos reductores expuestos en la molécula proteica por la desnaturalización, es relativamente pequeña.

Las determinaciones de grupos -SH accesibles (tabla II) ponen de relieve que la cinética de la disponibilidad de los mismos guarda un paralelismo con el progreso de la acción desnaturalizante sobre la proteína. Todo induce a pensar en la pluralidad de las acciones provocadas por el álcali en la molécula proteica: por una parte, la liberación relativamente rápida de los ligandos básicos hema-enlazantes, y por otra la hidrólisis de los puentes cistínicos (16) caracterizada por su mayor lentitud. Si se tiene en cuenta el exceso de proteína generalmente utilizado en la preparación de las combinaciones con la protohematina, es fácil deducir que el contenido final en grupos sulfhidrilo libres, una vez completa la rotura de los puentes disulfuro, resulte considerable, multiplicando las posibilidades de que ejerzan una acción reductora notable sobre el metal de la porfirina.

Los resultados de la reproducción, a nivel más sencillo, de los mecanismos supuestos (tabla III), mediante la reducción con  $\text{Na}_2\text{S}$  de las combinaciones de la tripsina, la  $\alpha$ -quimotripsina y la ovoalbúmina, y utilizando concentraciones de las proteínas inferiores a las que provocan el fenómeno de la autorreducción, parecen no estar en desacuerdo con lo expuesto hasta aquí. En el caso de la combinación de la ovoalbúmina, el bajo contenido en cistina de la proteína (tabla I), y tal vez una mayor inaccesibilidad del aminoácido en la molécula, podrían sugerir el por qué no tiene lugar la reducción implícita al ferrohemocromo. No debe omitirse aquí la comparación de los distintos potenciales de reducción de los iones  $\text{S}^{2-}$  y  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ , cuyos valores de 0,508 y 1,4, respectivamente, explican su distinto poder reductor.

El conjunto de las consideraciones que preceden pone de relieve que los fenómenos observados en relación con la reducción implícita de las combinaciones de la tripsina, de la  $\alpha$ -quimotripsina y de la ovoalbúmina con la protohematina, inducidos por la presencia de concentraciones

en exceso de dichas proteínas desnaturizadas, reviste una cierta complejidad. Parece fuera de duda, sin embargo, que los grupos reductores de la molécula proteica — hechos accesibles por la desnaturalización alcalina — ejerzan una decidida intervención.

### Resumen

Cuando la protohematina reacciona con la  $\alpha$ -quimotripsina, la tripsina o la ovoalbúmina, desnaturizadas en medio alcalino, y existe un exceso de proteína en la disolución, se observa espectralmente (aparición de las bandas características) que se provoca la reducción progresiva a ferrohemocromos de las ferricombinaciones. Este fenómeno, que tiene lugar con lentitud, es difícilmente observable si no se opera en condiciones anaerobias estrictas.

La relación molar Proteína/Hematina adecuada para que se produzca la transformación reductiva del ferrihemocromo de la  $\alpha$ -quimotripsina es 10/1 aproximadamente. La reducción del compuesto ferri- de la tripsina tiene lugar menos fácilmente — esta proteína es muy sensible a la degradación alcalina —, y es aún más difícil en el caso de la ovoalbúmina — que es más resistente a la desnaturalización.

Con las tres proteínas sometidas a desnaturalización alcalina en atmósfera inerte, se ha comprobado la liberación progresiva de grupos -SH.

La reducción de los ferrihemocromos de la  $\alpha$ -quimotripsina y de la tripsina provocada por cantidades de  $\text{Na}_2\text{S}$  equivalentes al contenido en grupos -SH hallado en las proteínas desnaturizadas empleadas, sugiere la intervención de dichos grupos reductores en el proceso.

### Summary

Coordination of  $\alpha$ -Chymotrypsin and Trypsin with Haematin. — II. Production of Ferrohaemochromes by the Reducing Action of Denatured Protein on Haematinic Iron

When protohaematin reacts with alkali denatured  $\alpha$ -chymotrypsin, trypsin or ovoalbumin, in a solution containing an excess of the protein, the progressive reduc-

tion of the ferrihaemochromes to the corresponding ferro- compounds which also takes place, can be spectrophotometrically detected by the appearance of the typical bands of the ferrohaemochromes.

The minimal Protein/Haematin molar ratio practically necessary to easily induce the reduction of  $\alpha$ -chymotrypsin ferrihaemochrome is about 10/1. The ferricompound of trypsin appears to be less readily reduced — this protein seems to be rather sensitive to a deep desintegration by alkali —, and even slower is the formation of the ferrohaemochrome of egg albumin — apparently rather resistant to alkali denaturation.

Those three proteins, when submitted to alkali degradation in anaerobic conditions, gradually liberate free -SH groups. The experimental fact that their ferrihaemochromes are transformed into ferrocompounds when treated by quantities of  $\text{Na}_2\text{S}$  equivalent to the thiol groupings formed present in the denatured proteins, suggest the responsibility of the sulphhydryls in the reductions of the ferricombinations that take place when an excess of the corresponding protein prevails.

### Bibliografía

1. BOYER, P. D.: En *The Enzymes*, Ed. Academic Press, Nueva York, Vol 1, p. 553, 1959.
2. CAUGHEY, W. J. y J. L. YORK: *J. Biol. Chem.*, 237, PC 2414, 1962.
3. CORNUDELLA, L. y J. CALVET: *R. esp. Fisiol.*, 24, 183, 1968.
4. DANNENBERG, H. y M. KIESE: *Biochem. Z.*, 322, 395, 1952.
5. HARTLEY, B. S.: *6th. Int. Cong. Biochem.*, IV-S6, N. Y., 1964.
6. HUGHES, W. L.: *Cold Spring Harbour Symposia Quant. Biol.*, 14, 79, 1950.
7. INGOLD, G. K.: En *Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, Ed. G. Bells and Sons Ltd., Londres, S. 423, 1953.

8. KATCHALSKI, E., G. S. BENJAMIN and V. GROSS: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4096, 1957.
9. KIESE, M. y H. KURZ: *Biochem. Z.*, **330**, 177, 1958.
10. LEMBERG, R.: *Biochem. Z.*, **338**, 97, 1963.
11. LEMBERG, R., D. B. MORELL, H. NEWTON y J. E. O'HAGAN: *Proc. Roy. Soc. (Londres), Ser. B*, **155**, 339, 1961.
12. LEMBERG, R. y A. VELINS: *Biochim. Biophys. Acta*, **104**, 487, 1965.
13. NICOLET, B. H. y L. A. SHINN: *103th Meeting Am. Chem. Soc.*, Abst., 1942.
14. PUTNAM, F. W.: En *The Proteins*, Ed. Academic Press, Nueva York, Vol. 1, Parte A, p. 217, 1954.
15. SCHÖBER, A., E. BERNIGER y F. HARREN: *Ber.*, **67**, 1545, 1934.
16. SPEAKMAN, J. B.: *Nature*, **132**, 930, 1933.
17. TARBELL, D. S. y D. P. HARNISH: *Chem. Revs.*, **49**, 1, 1951.
18. VANDERKOOI, G. y E. STOTZ: *J. Biol. Chem.*, **240**, 3418, 1965.
19. VANDERKOOI, G. y E. STOTZ: *J. Biol. Chem.*, **241**, 2260, 1966.
20. WARBURG, O. y H. S. GEWITZ: *Z. Physiol. Chem.*, **288**, 1, 1951.