

VCH-FC  
MAG-B  
N 973

**CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA DE HEXOQUINASAS A DE MAMIFEROS**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Bioquímica

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

por 

**LUCINDA NUÑEZ NUÑEZ**

**1983**

Patrocinante de Tesis: Dr. Tito Ureta

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Magister de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la Candidata

**Lucinda Núñez Núñez**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Bioquímica, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día

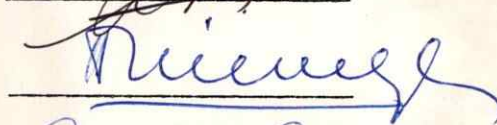
Patrocinante de Tesis

  
\_\_\_\_\_

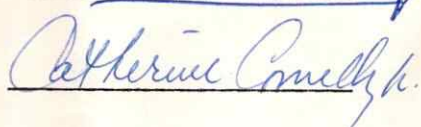
Comisión Informante de Tesis

  
\_\_\_\_\_

*Dr. Alfredo de la Cruz*

  
\_\_\_\_\_

F.

  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Tito Ureta.

## AGRADECIMIENTOS

Particularmente me complace reconocer la valiosa colaboración y dirección de mi Profesor Tutor Dr. Tito Ureta A. quien ha querido dirigir este trabajo con paciencia y amistad. Quiero destacar el interés constante que ha puesto en él; sus críticas y exigencias han sido para mí un estímulo muypreciado. Tampoco puedo dejar de reconocer que sus sugerencias y enseñanzas han sido factores importantes en mi formación.

Deseo exteriorizar mi gratitud al Profesor Dr. Hermann Niemeyer F., Jefe del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, por su eficaz contribución al desarrollo de esta Tesis. Sus críticas siempre acertadas y su aporte valioso de conocimientos no pueden ser olvidados ni tampoco las facilidades y excelentes condiciones de trabajo que siempre obtuve en su laboratorio. Agradezco el haberme dado la oportunidad de compartir durante todo este tiempo con un grupo de extraordinaria calidad humana.

Mi reconocimiento al Dr. Alfredo de Ioannes por su valiosa asesoría, sus comentarios siempre útiles y sus acertados consejos en el estudio inmunológico correspondiente.

A la señora Patricia Salinas por sus sobresalientes características personales y su desinteresada colaboración en las técnicas de Microfijación del complemento.

A las autoridades de la Universidad de Antofagasta por haberme dado las facilidades para realizar esta Tesis.



A mis padres y hermanos

## INDICE DE MATERIAS

Lista de Tablas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xi
<b>RESUMEN</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	5
Reactivos	5
Animales de experimentación	5
Medición de la actividad enzimática	7
Purificación de hexoquinasa A	7
Preparación de hexoquinasas de hígado de rata	9
Determinación de proteínas	9
Electroforesis en geles de poliacrilamida	9
Preparación de suero inmune anti-hexoquinasa A	10
Reacciones inmunológicas	11
Efecto del antisuero sobre la actividad hexoquinásica	11
Inmunodifusión doble	12
Inmunoelectroforesis	13
Retención de la actividad enzimática por inmunoabsorbentes	13
Microfijación del complemento	14

<b>RESULTADOS</b>	<b>17</b>
1. Purificación de hexoquinasa A de cerebro de rata	17
2. Obtención y caracterización de suero inmune anti-hexoquinasa A de rata	21
2.1. Efecto del suero inmune sobre la actividad enzimática de hexoquinasa A de cerebro	21
2.2. Doble inmunodifusión	22
2.3. Inmunoelectroforesis	27
2.4. Retención de la actividad enzimática por inmunoabsorbentes	27
3. Reactividad inmunológica cruzada de las cuatro hexoquinasas de rata	29
4. Reactividad inmunológica cruzada de hexoquinasas A de mamíferos	35
4.1. Efecto del suero inmune sobre la actividad enzimática	35
4.2. Retención por columnas inmunoabsorbentes	38
4.3. Experimentos de doble inmunodifusión	40
4.4. Microfijación del complemento	46
<b>DISCUSION</b>	<b>52</b>
Características del suero inmune anti-hexoquinasa A de rata	52
Relaciones inmunológicas de las cuatro hexoquinasas de rata	52
Consideraciones acerca de la estructura de las hexoquinasas	55
Estudios comparativos	56

CONCLUSIONES	60
ANEXOS	
ANEXO 1. Preparación de matrices inmunoabsorbentes	62
ANEXO 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	64
ANEXO 3. Microfijación del complemento	67
REFERENCIAS	71



## LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla I	Mamíferos usados y fuentes de obtención	6
Tabla II	Purificación de hexoquinasa A de cerebro de rata	18
Tabla III	Inmunoabsorción de las hexoquinasas A, B, C o D de hígado de rata por suero inmune o suero control ligados a Sepharose	34
Tabla IV	Inmunoabsorción de hexoquinasas A de cerebro de varios mamíferos por suero inmune o suero control ligados a Sepharose	39
Tabla V	Distancias inmunológicas aparentes entre hexoquinasas A de varios mamíferos	51

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Fig. 1 Electroforesis en poliacrilamida de hexoquinasa A de cerebro de rata	19
Fig. 2 Efecto del suero anti-hexoquinasa A sobre la actividad de hexoquinasa A de cerebro de rata. Efecto de la concentración de suero	23
Fig. 3 Titulación del suero inmune anti-hexoquinasa A con hexoquinasa A de cerebro de rata	24
Fig. 4 Análisis por inmunodifusión de la reacción entre suero inmune y hexoquinasa A de cerebro de rata. Influencia de la concentración de enzima	25
Fig. 5 Análisis por inmunodifusión de la reacción entre suero inmune y hexoquinasa A de cerebro de rata. Influencia del estado de purificación	26
Fig. 6 Análisis por inmunoelectroforesis de la reacción entre suero inmune y hexoquinasa A de cerebro de rata	28
Fig. 7 Efecto del suero anti-hexoquinasa A sobre la actividad de las hexoquinasas A, B, C y D de hígado de rata. Efecto de la concentración de suero	30
Fig. 8 Análisis por inmunoelectroforesis de la reacción entre suero inmune y hexoquinasa A de cerebro o de hígado	31
Fig. 9 Análisis por inmunodifusión de la reacción entre suero inmune anti-hexoquinasa A de cerebro y las hexoquinasas A, B, C y D de hígado de rata	32

Fig. 10	Efecto del suero anti-hexoquinasa A de rata sobre la actividad de hexoquinasa A de varios mamíferos. Efecto de la concentración de suero	37
Fig. 11	Análisis por inmunodifusión de la reacción cruzada entre las hexoquinasas A de rata y de ratón ( <u>Mus musculus</u> )	41
Fig. 12	Análisis por inmunodifusión de la reacción cruzada entre hexoquinasas A de roedores cricétidos y de rata	42
Fig. 13	Análisis por inmunodifusión de la reacción cruzada entre las hexoquinasas A de rata y de degu ( <u>Octodon degus</u> )	43
Fig. 14	Análisis por inmunodifusión de la reacción cruzada entre las hexoquinasas A de rata y de conejo ( <u>Oryctolagus cuniculus</u> )	44
Fig. 15	Análisis por inmunodifusión de la reacción cruzada entre hexoquinasas A de artiodáctilos rumiantes y de rata	45
Fig. 16	Microfijación del complemento por la reacción hexoquinasa A vs suero anti-hexoquinasa A. Efecto de la dilución de antisuero	47
Fig. 17	Microfijación del complemento por anti-hexoquinasa A y hexoquinasa A de varios mamíferos	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

DEAE-celulosa	Dietil-amino-etil-celulosa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetra-acético
TEMED	N,N,N,N' tetrametilendiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano



## RESUMEN

Se describe la preparación y caracterización de un suero anti-hexoquinasa A de cerebro de rata y su uso para estudiar las relaciones estructurales de las hexoquinasas de varias especies de mamíferos.

Se purificó hexoquinasa A hasta homogeneidad a partir de mitocondrias de cerebro de rata. El procedimiento de purificación consistía esencialmente en la separación de las mitocondrias por centrifugación diferencial, solubilización específica de la hexoquinasa por incubación de las mitocondrias con glucosa-6-P y cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción solubilizada. La preparación final tenía una actividad específica de aproximadamente 57 unidades/mg de proteína. En geles de poliacrilamida presentaba una sola banda de proteína que coincidía con la banda de actividad. La enzima purificada se inyectó en conejos para producir un suero inmune. 1 ml de este suero era capaz de inmunoprecipitar 34 unidades de la hexoquinasa A usada como antígeno.

Mediante inmunodifusión e inmunoelectroforesis en placas de agarosa se observó la presencia de una banda de precipitación única al reaccionar el suero con las preparaciones homogéneas o con extractos crudos de la enzima homóloga. La banda observada en placas de inmunodifusión presentaba actividad enzimática.

El suero inmune era capaz de disminuir la actividad de la hexoquinasa A de cerebro o de hígado de rata. Sin embargo, la actividad de las hexoquinasas B, C o D de hígado no era afectada por el suero en condiciones experimentales iguales a las que producían disminución de la actividad de hexoquinasa A. Al enfrentar suero inmune y hexoquinasa A de hígado o cerebro, en placas de inmunodifusión, se observó una banda de precipitación continua al depositar ambas enzimas en pocillos adyacentes. La continuidad de las bandas indica que las dos proteínas son inmunológicamente indistinguibles. Sin embargo no se observaron líneas de precipitación al usar hexoquinasas B, C o D semipurificadas de hígado de rata. Todavía más, el suero inmune ligado a Sepharose fue capaz de retener cuantitativamente la actividad de hexoquinasa A de cerebro o hígado, pero no la de las hexoquinasas B, C o D de hígado.

En condiciones en que el suero inmune disminuía la actividad de hexoquinasa A de rata en ~95%, la actividad de la enzima aislada de algunos mamíferos fue solo parcialmente afectada: ratón (Mus musculus): 30%; hamster (Mesocricetus auratus), ratoncito oliváceo (Akodon olivaceus), ratoncito orejudo (Phyllotis darwini), cuy (Cavia porcellus) y degu (Octodon degus): ~40%; conejo (Oryctolagus cuniculus): 60%; oveja (Ovis aries): 10%; vaca (Bos taurus): 5%.

Las hexoquinasas A de ratón, hamster, degu y conejo fueron retenidas casi totalmente (93 a 98%) en una columna de antisuero ligado a Sepharose. La enzima de bóvido fue solo parcialmente retenida. En experimentos de doble inmunodifusión con enzimas de varias especies, se observaron bandas de precipitación de identidad parcial con espolones de longitud variable.

El análisis de la reacción inmunológica usando el suero inmune y hexoquinasa A de varios mamíferos mediante la microfijación de complemento permitió una mayor discriminación de las diferencias estructurales existentes entre esas hexoquinasas. Las distancias inmunológicas aparentes observadas mostraron las relaciones esperadas para esas especies.

Se concluye que la ausencia de reacción inmunológica cruzada entre hexoquinasa A y las hexoquinasas B, C o D se debe a sustituciones de aminoácidos superficiales en la molécula de hexoquinasa A. La velocidad de tales sustituciones parece ser mayor en hexoquinasa A que en las otras hexoquinasas.



## ABSTRACT

The preparation and characterization of an immune serum anti-hexokinase A from rat brain, and its utilization for the study of the structural relationships of the hexokinases of several mammals, are described.

Hexokinase A was purified to homogeneity from rat brain mitochondria. The purification protocol consists of the separation of mitochondria by differential centrifugation, specific solubilization of hexokinase by glucose-6-P, and DEAE-cellulose chromatography of the solubilized fraction. The final preparation had a specific activity of about 57 units/mg of protein and, in polyacrylamide gels, showed one protein band coincident with a band showing enzyme activity. The purified enzyme was injected in rabbits to elicit an immune serum. One ml of the serum could immunoprecipitate 34 units of hexokinase A used as antigen.

Immunodiffusion and immunoelectrophoresis revealed a single precipitation line when either the pure enzyme or crude extracts were tested. Precipitin lines, in immunodiffusion plates, were enzymically active.

Enzyme activity of hexokinase A from either rat brain or liver was decreased by the serum. On the other hand, the activity of liver hexokinases B, C or D was not affected when tested in conditions identical to those in which inhibition of hexokinase A



could be demonstrated. Immunodiffusion using liver hexokinase A revealed a precipitin band which fused with the band produced by brain hexokinase A in an adjacent well, indicating that both proteins are immunologically indistinguishable. No precipitin bands were observed when liver hexokinases B, C or D were tested. Furthermore, brain or liver hexokinase A activity was quantitatively bound by an immune serum-Sepharose matrix whereas the activities of liver hexokinases B, C or D was not bound.

Under conditions in which the immune serum decreased 95% of the activity of rat hexokinase A, the activities of hexokinases A from some mammals were only partially inhibited: mouse (Mus musculus): 30%; hamster (Mesocricetus auratus), field-mouse (Akodon olivaceus), leaf-eared mouse (Phyllotis darwini), guinea-pig (Cavia porcellus) and degu (Octodon degus): 40%; rabbit (Oryctolagus cuniculus): 60%; sheep (Ovis aries): 10%, and cow (Bos taurus): 5%.

Hexokinases A from mouse, hamster, degu and rabbit were almost completely retained (93 to 98%) by a column of antibody bound to Sepharose. The bovine enzyme was partially retained. Immunodiffusion analyses using the enzymes from several mammals revealed precipitin lines of partial cross-reactivity with spurs of variable length.

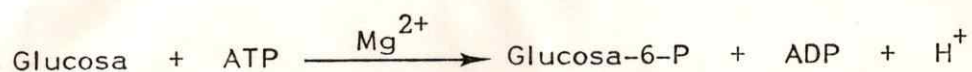
A better immunological discrimination of the structural differences between the hexokinases A from several mammals was accom-

plished through complement microfixation studies. Observed apparent immunological distances showed the expected relationships for the species studied.

It is suggested that the absence of immunological cross-reaction between hexokinase A and hexokinases B, C or D is due to amino acid substitutions on the surface of the hexokinase A molecule. The rate of such substitutions seems to be higher in hexokinase A than in the other hexokinases.

## INTRODUCCION

La fosforilación de glucosa y otras hexosas es catalizada por enzimas llamadas hexoquinasas (ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasas, EC 2.7.1.1):



En un gran número de organismos esta enzima se presenta en formas múltiples o isoenzimas. En la rata y otros vertebrados se ha descrito un máximo de cuatro hexoquinasas denominadas A, B, C y D de acuerdo con su orden de elución en columnas de DEAE-celulosa (González et al., 1964; 1967; Grossbard y Schimke, 1966; Ureta et al., 1979; Ureta, 1982). Además de su carga eléctrica neta a pH neutro, las cuatro hexoquinasas difieren en los valores de las constantes de Michaelis para glucosa, su conducta cinética, la dependencia de sus niveles tisulares según la composición de la dieta y la disponibilidad de ciertas hormonas, su presencia en diversos tejidos y el momento de su aparición durante la organogénesis. Las cuatro isoenzimas son monómeros de peso molecular 100.000 en el caso de las hexoquinasas A, B y C, y 50.000 en el caso de hexoquinasa D. Se han publicado varias revisiones generales sobre esta familia de isoenzi-



mas (Walker, 1966; Niemeyer y Ureta, 1972; Purich et al., 1973; Niemeyer et al., 1975; Ureta, 1975; Weinhouse, 1976; Ureta et al., 1979; Ureta, 1982).

La presencia de cuatro hexoquinasas con las características mencionadas permite la formulación de una serie de interrogantes de interés para entender la participación de las isoenzimas en la operación y regulación del metabolismo (Ureta, 1978). En este laboratorio se ha dedicado bastante esfuerzo a la enzimología comparada de las hexoquinasas de vertebrados con la esperanza de vislumbrar la función que cada isoenzima cumple en el metabolismo celular. Así, los perfiles cromatográficos de las hexoquinasas se han estudiado en el hígado de casi cien especies de vertebrados, encontrándose importantes diferencias tanto en el número de isoenzimas presentes como en su proporción relativa (Ureta et al., 1979; Ureta, 1982). Por el momento, tales diferencias no han permitido establecer correlaciones que ayuden a conocer la función específica de cada una de las hexoquinasas.

Para profundizar el estudio comparativo de las hexoquinasas parece necesario investigar sus estructuras y establecer comparaciones entre las cuatro isoenzimas de una misma especie y entre la misma isoenzima aislada de varias especies. Estudios de ese tipo se han realizado en unos pocos sistemas isoenzimáticos y han proporcionado información valiosa acerca de los mecanismos moleculares de producción de formas múltiples. Merecen especial mención



las investigaciones de los grupos de Markert (Markert, 1968; Markert et al., 1975) y de Kaplan (1968) en las lactato-deshidrogenasas, y los de Rutter y sus colaboradores (Rutter et al., 1968; Lebherz et al., 1973) en fructosa-bisfosfato-aldolasas. Tales estudios estructurales comparativos han debido, por necesidad, restringirse a la investigación de características estructurales gruesas, como por ejemplo composición de aminoácidos o reactividad inmunológica cruzada, ya que los estudios de estructura primaria o terciaria (que han dado espectaculares resultados en el caso de citocromo c y hemoglobinas) requieren todavía de cantidades relativamente grandes de proteína las que no siempre se pueden obtener de algunas especies.

Cualquier estudio estructural presupone necesariamente la purificación hasta homogeneidad de la o las enzimas que se desea analizar. En el caso de las hexoquinasas solo ha sido posible purificar algunas de ellas hasta homogeneidad. Varios autores (Schwartz y Basford, 1967; Redkar y Kenkare, 1972; Chou y Wilson, 1972; Easterby y O'Brien, 1973) han comunicado el aislamiento de hexoquinasa A en estado de alta pureza. La hexoquinasa B de músculo de rata ha sido purificada por Holroyde y Trayer (1976). Aún no se ha publicado ningún procedimiento para la purificación de hexoquinasa C. Existen unos pocos protocolos para el aislamiento de hexoquinasa D de hígado de rata (Grossman et al., 1973; Holroyde et al., 1976; Toro, 1982) y de perro (Maccioni y Babul, 1980). Con estas enzimas puras se han realizado

algunas investigaciones estructurales que se reseñarán más adelante, pero ninguna de ellas se ha referido al aspecto comparativo que nos preocupa.

Chou y Wilson (1972) han comunicado un procedimiento simple para purificar hexoquinasa A homogénea y con alto rendimiento a partir de cerebro de rata. El protocolo de purificación aprovecha la localización mitocondrial de una parte de la actividad hexoquinásica cerebral y su liberación específica por glucosa-6-P. Un suero inmune obtenido en conejo con esta preparación ha sido utilizado por Wilkin y Wilson (1977) para estudiar la localización tisular y subcelular de la enzima en el sistema nervioso central de la rata.

Esta Tesis describirá la obtención de un suero inmune anti-hexoquinasa A, su caracterización y utilización en el estudio de hexoquinasa A de varias especies de vertebrados. Se mostrará que este anticuerpo es específico para hexoquinasa A ya que no reacciona con hexoquinasas B, C o D. El suero inmune solo reconoce parcialmente a hexoquinasa A de roedores y de lagomorfos (conejo) y su reacción cruzada es mínima con enzimas provenientes de otros animales fuera del Orden Rodentia.

## MATERIALES Y METODOS

### Reactivos

De Sigma Chemical Co., St. Louis, EEUU, se obtuvieron los siguientes reactivos: sacarosa, glucosa,  $\text{NADP}^+$ , ATP, Tris, acrilamida, bis-acrilamida, glicina, negro de amida, trietanolamina, Glc-6-P, nitroazul de tetrazolio, fenazina metosulfato, albúmina de bóvido, DTT, glicerol, Glc-6-P-deshidrogenasa tipo VII de levadura. De Merck, Darmstadt, Alemania Federal, se adquirieron fosfato monopotásico, fosfato dipotásico, EDTA, KCl, HCl, NaCl, azul de bromofenol, ácido acético,  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , fenol, gelatina,  $\text{FeCl}_3$ , tiocianato de potasio, acetonitrilo, bromuro de cianógeno, ácido bórico, azida sódica, metanol. De Whatman, Maidstone, Inglaterra, se obtuvo DEAE-celulosa microgranular (DE-52). De Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia, provenían agarosa A y Sepharose 4B. De Polysciences, Warrington, EEUU, se obtuvieron TEMED y persulfato de amonio.

Hemolisina, glóbulos rojos de cordero y complemento de suero de cuy fueron gentilmente donados por la Sra. Patricia Salinas, del Laboratorio de Serología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### Animales de experimentación

Los animales utilizados y las fuentes de obtención se detallan en la Tabla I.



TABLA I  
Mamíferos usados y fuentes de obtención

Orden	Especie	Nombre común
RODENTIA	<i>Rattus norvegicus</i>	<sup>1</sup> Rata
	<i>Mus musculus</i>	<sup>2</sup> Ratón
	<i>Phyllotis darwini</i>	<sup>3</sup> Ratoncito orejudo
	<i>Akodon olivaceus</i>	<sup>3</sup> Ratoncito oliváceo
	<i>Mesocricetus auratus</i>	<sup>4</sup> Hamster
	<i>Octodon degus</i>	<sup>4</sup> Degu
	<i>Cavia porcellus</i>	<sup>5</sup> Cuy
LAGOMORPHA	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<sup>6</sup> Conejo
ARTIODACTYLA	<i>Ovis aries</i>	<sup>7</sup> Oveja
	<i>Bos taurus</i>	<sup>8</sup> Vaca

<sup>1</sup>Cepa Wistar, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile. <sup>2</sup>Cepa Swiss-Rockefeller, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile (cortesía Dr. Luis Izquierdo). <sup>3</sup>Donación del Dr. Mario Rosenmann, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. <sup>4</sup>Laboratorio de Embriología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile (cortesía Dr. Claudio Barros). <sup>5</sup>Adquiridos en casas comerciales. <sup>6</sup>Instituto Bacteriológico de Chile. <sup>7</sup>Matadero Lo Valledor. <sup>8</sup>Matadero Municipal de Santiago.



### Medición de la actividad hexoquinásica

La actividad fosforilante de glucosa se ensayaba por medio de la producción de Glc-6-P acoplado la reacción hexoquinásica al sistema  $\text{NADP}^+$  y Glc-6-P-deshidrogenasa (Slein et al., 1950). La formación de NADPH se seguía a 340 nm en un espectrofotómetro Gilford modelo 2400 a 30° en un medio de la siguiente composición (concentraciones finales): KCl 10 mM, Tris-HCl 100 mM (pH 7,5),  $\text{MgCl}_2$  12,6 mM, ATP 5 mM, glucosa 0,5 mM, EDTA 1,6 mM,  $\text{NADP}^+$  0,5 mM y 0,1 U de Glc-6-P-deshidrogenasa. El volumen final de la reacción era de 0,5 ml. Como blanco de la reacción se usaba el mismo sistema de incubación, pero omitiendo el ATP.

La unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que cataliza la fosforilación de 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa en 1 min a 30°, en las condiciones señaladas.

### Purificación de hexoquinasa A

Se utilizaron cerebros de diversos animales, sacrificados generalmente por decapitación excepto en los casos de vacas y ovejas. Se trabajaba con 20 a 25 g de cerebro en cada preparación. En la mayor parte de los experimentos la enzima se extraía y purificaba de acuerdo al procedimiento de Chou y Wilson (1972) que consiste en preparar mitocondrias a partir de homogeneizados al 10% en sacarosa 0,25 M. Las mitocondrias se lavaban tres veces por suspensión en esta misma solución y

centrifugación a 40.000 g durante 30 min. La hexoquinasa A se solubilizaba por incubación de las mitocondrias en Glc-6-P 1 mM, sacarosa 0,25 M, durante 60 min a 30°. Luego de incubar, las mitocondrias se centrifugaban a 105.000 g en una ultracentrífuga Spinco modelo L o Beckman L5-50B durante 60 min y el líquido sobrenadante, que contiene a la enzima, se cromatografiaba en una columna de DEAE-celulosa (16 x 2 cm), previamente equilibrada con fosfato 10 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM, glucosa 10 mM (amortiguador A). La enzima retenida se eluía mediante un gradiente lineal de KCl entre 0 y 0,3 M en amortiguador A, con un volumen total de 240 ml. Se recolectaban fracciones en un microfraccionador Gilson y se combinaban aquellas con más altos niveles de actividad enzimática. El volumen resultante, entre 30 y 40 ml, se reducía a alrededor de 1 ml por concentración en un aparato de filtración Amicon con membranas PM 10.

En algunos casos, la hexoquinasa A se obtenía preparando un homogeneizado de cerebro al 10% en amortiguador A que se centrifugaba durante 60 min a 105.000 g en una ultracentrífuga Spinco modelo L. El líquido sobrenadante se cromatografiaba en una columna de DEAE-celulosa como se describió en el párrafo anterior.

La concentración de KCl se determinaba midiendo la conductividad de las soluciones en un conductímetro Radiometer, modelo CDM 2f.

### Preparación de hexoquinasas de hígado de rata

Las hexoquinasas de hígado de rata fueron separadas utilizando el procedimiento descrito por González et al. (1964). Se utilizaban ratas sacrificadas por decapitación sin anestesia. Todas las etapas se realizaban a 4°. El hígado se removía y colocaba en hielo. Se preparaba un homogeneizado al 50% (p/v) en amortiguador Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM, usando un homogeneizador Potter-Elvehjem. El homogeneizado se centrifugaba a 105.000 g durante 60 min. El líquido sobrenadante se cromatografiaba en columnas de DEAE-celulosa y las isoenzimas retenidas se eluían mediante gradiente lineal de KCl de 0 a 0,5 M.

### Determinación de proteínas

La concentración de proteínas de diferentes fracciones se determinaba por dos procedimientos: 1) Por medición de la absorbancia a 280 nm, empleando el coeficiente de extinción molar ( $E_{280 \text{ nm}}$ ) de  $5 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  (Chou y Wilson, 1972). 2) Por medición de la absorbancia a 595 nm del compuesto formado por la proteína en presencia de Azul Brillante de Coomassie G (Bradford, 1976).

### Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las preparaciones de hexoquinasa A se sometían a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7%, según el procedimiento de Davis (1964). Habitualmente se sembraban 50 a 70  $\mu\text{g}$  de proteína



y se aplicaba una corriente de 3 mA por gel. Las bandas de proteínas se visualizaban incubando los geles en solución de negro de amida en ácido acético, o de Azul Brillante de Coomassie G, durante 60 min. En ambos casos, el exceso de colorante se eliminaba con ácido acético 7% en un aparato (BioRad) de destinción por difusión.

Para teñir actividad enzimática, los geles se preparaban y la electroforesis se efectuaba según Grossman y Potter (1974) y luego se incubaban en un medio similar al empleado en el ensayo espectrofotométrico de actividad enzimática, pero adicionando fenazina metosulfato 0,4 mg/ml y azul de nitrotetrazolio 4 mg/ml.

Más detalles acerca del procedimiento general se especifican en el Anexo 2 "Electroforesis en geles de poliacrilamida".

#### Preparación de suero inmune anti-hexoquinasa A

Se utilizaron dos conejos de raza Nueva Zelandia, a cada uno de los cuales se inyectó, en los cojinetes plantares y subcutáneamente en diversas partes del cuerpo, una suspensión que contenía 1 mg de hexoquinasa A pura de rata y coadyuvante de Freund completo en amortiguador A. Las inyecciones se repitieron tres veces, cada tres semanas, con una suspensión similar pero con coadyuvante incompleto. Durante ese tiempo se controlaba la capacidad del suero para inhibir la actividad enzimática. Al cabo de doce semanas los conejos se desangraron por punción

cardíaca. La sangre extraída se dejó a temperatura ambiente hasta su total coagulación y posteriormente se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min. El suero se guardaba congelado a  $-20^{\circ}$ , en fracciones de 2 ml.

En ocasiones se utilizó una preparación semipurificada del suero inmune. Para ello se precipitó el suero, agregando un volumen de sulfato de amonio a saturación y después de centrifugar a 15.000 rpm por 10 min, el precipitado se resuspendió en amortiguador A. Se dializó durante 24 h contra la misma solución y la fracción resultante se guardó a  $-20^{\circ}$ .

Como control se utilizó el suero de un conejo no inmunizado, obtenido en las mismas condiciones.

### Reacciones inmunológicas

#### i. Efecto del antisuero sobre la actividad hexoquinásica

Las preparaciones de hexoquinasa A de diversos animales se incubaban con cantidades variables de suero inmune, o suero control, durante 30 min a  $30^{\circ}$ , y luego toda la noche a  $4^{\circ}$ . El suero y las preparaciones de enzima se diluían en amortiguador A. El precipitado formado se descartaba por centrifugación a 10.000 rpm en una centrífuga Sorvall RC 2B en un rotor SS-34 y se medía la actividad remanente en el líquido sobrenadante. Generalmente se usaban entre 14 y 22 mU de enzima y diluciones de suero hasta de 1/500. Para estos experimentos se calentaba el suero a  $56^{\circ}$  por 10 min para producir la descomplementación.



## ii. Inmunodifusión doble

Se utilizaba la técnica de Hudson y Hay (1979). Las soluciones de agarosa se preparaban al 2% en agua y se diluían al 1%, en el momento de preparar las placas, con amortiguador A que contenía azida de sodio 0,004%. Las preparaciones de enzima se concentraban hasta obtener una actividad de 0,12 a 0,24 U/ml. Luego de llenar los pocillos, las placas se incubaban durante 48 h a 4°. Posteriormente, las placas se lavaban dos veces con una solución de amortiguador Tris 10 mM (pH 8,0), NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, luego con NaCl 0,2 M durante la noche y finalmente con 3 a 4 cambios de agua desionizada durante 3 a 4 h cada vez. Generalmente se hacían dos placas por experimento, una de las cuales se teñía para proteínas y la otra para actividad enzimática. En el primer caso, se cubría la placa con papel filtro Whatman N° 1 y se dejaba secar a temperatura ambiente. La placa seca se incubaba durante 10 min en una solución de negro de amida (Amido Black 1 g, ácido acético 1 M 425 ml, acetato de sodio 0,1 M 425 ml, glicerol 150 ml). Después de teñir, se retiraba el exceso de colorante lavando con una solución de ácido acético 2%-glicerol 15%. Para teñir la actividad enzimática del precipitado antígeno-anticuerpo se incubaban las placas a 30° durante 10 a 20 min en una solución que contenía Tris-HCl 80 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 12 mM, EDTA 1 mM, NADP<sup>+</sup> 0,5 mM, Glc-6-P-deshidrogenasa 0,2 U, ATP 0,5 mM, 0,05 mg de fenazina metosulfato y 0,5 mg de azul de nitrotetrazolio.



### iii. Inmunolectroforesis

Se depositaban 3,5 ml de agarosa al 1% en amortiguador barbital 75 mM (pH 8,6), en una placa de vidrio de 7,5 x 2,5 cm. Después de solidificar se perforaban pocillos a 2 cm de un extremo de la placa (cátodo) y en ellos se depositaban alrededor de 5  $\mu$ g de los antígenos en estudio. Simultáneamente se corría una placa con suero control más 5  $\mu$ l de azul de bromofenol 0,01% como indicador. Las placas se colocaban en una cámara electroforética que contenía la solución de barbital y se aplicaba una corriente constante de 4 mA por placa durante 60 min. Al término de la electroforesis se cortaba una canaleta en la parte central de la placa, dejando a ambos lados los pocillos destinados al antígeno. La canaleta se llenaba con el suero inmune y la placa se incubaba durante 48 h en una cámara húmeda, para que se desarrollaran los arcos de precipitación. Las placas se lavaban con suero fisiológico por 48 h y luego se secaban a temperatura ambiente, colocando un papel filtro en la superficie. Una vez secas se sumergían en una solución para tinción de proteínas por 15 min y se trataban como se indicó antes.

### iv. Retención de la actividad enzimática por inmunoadsorbentes

La capacidad de retención de la actividad hexoquinásica por anticuerpos ligados a Sepharose 4B, se estudió con el método de March et al. (1974). La activación de Sepharose 4B, fijación de

los sueros y regeneración del inmunoabsorbente se detallan en el Anexo 1 "Preparación de matrices inmunoabsorbentes". Se prepararon dos columnas (5 x 1 cm), una con suero inmune y otra con suero control. En un experimento típico las columnas se sembraban con alrededor de 100 mU de enzima y se eluían con amortiguador borato NaCl 0,5 M (pH 8,6). Se recogían fracciones de 0,5 ml y se medía la actividad no retenida en las columnas en alícuotas de 0,1 ml.

#### v. Microfijación del complemento

Los experimentos de fijación del complemento se realizaron según el procedimiento de Wasserman y Levine (1950). Las mezclas de reacción contenían una mezcla amortiguadora (pH 7,5) formada por trietanolamina, sales y gelatina (su preparación se describe en el Anexo 3 "Microfijación del complemento") a la que se agregaba suero inmune diluido, generalmente 1/1600, complemento de cuyas concentraciones variables de antígeno (5 a 60 ng). Los tubos que contenían estas mezclas se incubaban durante 18 h a 4°. Posteriormente se agregaba un sistema hemolítico constituido por glóbulos rojos de cordero y su hemolisina. Después de incubar durante 60 min a 37°, se centrifugaban los tubos y se determinaba la absorbancia a 413 nm de los líquidos sobrenadantes.

Cada experimento constaba de 12 tubos que contenían los siguientes componentes:

Componente	Número del tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	ml											
Amortiguador	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,6
Antisuero	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-
Complemento	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	-
Enzima	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-
INCUBACION A 2°-4° POR 18 HORAS												
Sistema hemolítico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Los tubos 1 al 7 contenían concentraciones crecientes de antígeno (5 a 60 ng). Los tubos 8 y 9 se utilizaban para investigar las propiedades pro- y anti-complementarias del anti-suero y del antígeno, respectivamente. Los tubos 10 y 11 correspondían a los controles de la actividad hemolítica de dos concentraciones diferentes de complemento. El tubo 12 indicaba el grado de hemólisis espontánea del sistema hemolítico.

La lisis de los glóbulos rojos en el tubo control 11 ocurría entre los 15 y 20 min. La lisis en el tubo control 8 (control de anti-suero) y en el tubo control 10, se producía entre 30 y 35 min. Los tubos se retiraban del baño de incubación cuando había ocurrido 80 a 85% de lisis en los tubos controles.

El porcentaje de lisis en los tubos controles se obtiene de la siguiente relación:



$$\% \text{ lisis controles} = \frac{\text{Absorbancia (tubo 8)} - \text{Absorbancia (tubo 12)}}{\text{Absorbancia (tubo 11)} - \text{Absorbancia (tubo 12)}} \times 100$$

En los experimentos que se describirán más adelante, la media  $\pm$  E.S de lisis en los tubos controles fue de  $81,6 \pm 1,02 \%$  (n = 6).

La magnitud de fijación del complemento se expresa como la diferencia entre la absorbancia del tubo control de antisuero (tubo 8) y la absorbancia del tubo problema. Los valores de fijación del complemento vs concentración de antígeno resultan típicamente en curvas campaniformes en las que no hay fijación de complemento con exceso de antígeno o de antisuero.

El factor por el cual debe diluirse el antisuero para obtener 75% de fijación de complemento en el punto máximo de la curva con antígeno homólogo, es el título del antisuero. En nuestros experimentos el título era 1750.

La obtención, manejo y control de los componentes de la técnica de fijación de complemento se detallan en el Anexo 3 "Microfijación del complemento".

## RESULTADOS

## 1

PURIFICACION DE HEXOQUINASA A  
DE CEREBRO DE RATA

Como se mencionó en la Introducción, se conocen varios métodos para el aislamiento de hexoquinasa A de cerebro. De entre ellos se eligió el de Chou y Wilson (1972) por su simplicidad y alto rendimiento. El procedimiento (descrito con detalle en **Materiales y Métodos**) consiste en purificar mitocondrias por centrifugación diferencial (Etapa 1), solubilizar específicamente la hexoquinasa por incubación de las mitocondrias con Glc-6-P 1 mM (Etapa 2), cromatografiar en DEAE-celulosa la preparación solubilizada (Etapa 3), y concentrar por ultrafiltración las fracciones apropiadas (Etapa 4).

Un protocolo típico se muestra en la Tabla II. La preparación final presentaba una actividad específica de  $57 \pm 2$  unidades/mg de proteína (promedio y error típico de 10 observaciones). La electroforesis en poliacrilamida reveló una banda de proteína la que coincide con la obtenida por tinción de actividad enzimática (Fig. 1). La actividad específica y los rendimientos son similares a los comunicados por Chou y Wilson (1972).

Tabla II

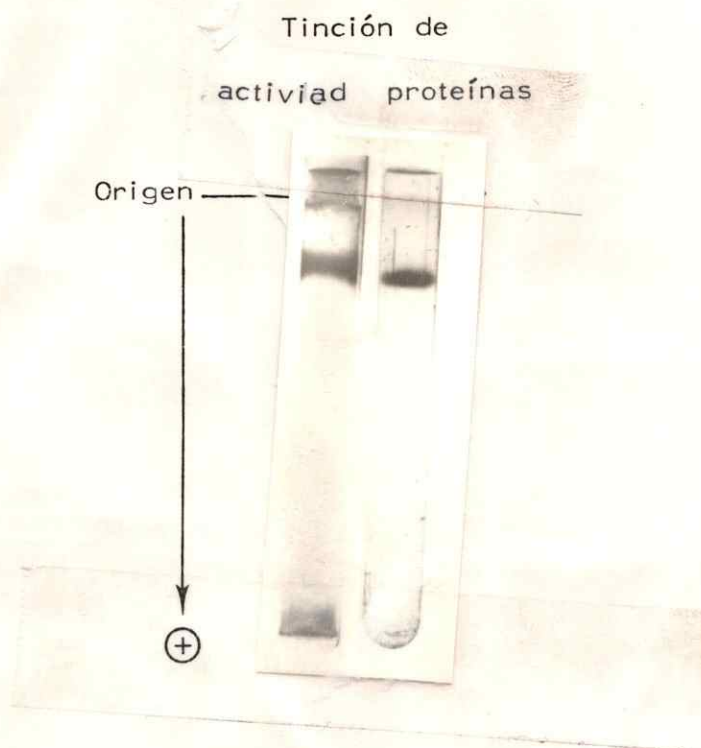
Purificación de hexoquinasa A de cerebro de rata\*

Etapa	Volumen mL	Actividad enzimática U/mL	Proteínas mg/mL	Actividad específica U/mg	Recupe- ración %	Purifi- cación veces
1. Mitocon- dria	282	0,65	1,4	0,5	100	1
2. Solubi- lización	565	0,28	0,02	14	86	30
3. DEAE- celulosa	40	3,7	0,09	41	81	82
4. Concen- tración	3,5	25,8	0,43	60	49	118

\*El procedimiento de purificación fue exactamente el descrito en **Materiales y Métodos**. Se utilizaron 28 g de cerebro de rata como material de partida. La concentración de proteínas fue estimada por el método de Bradford (1976).



Figura 1

ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA DE  
HEXOQUINASA A DE CEREBRO DE RATA

Aproximadamente 50  $\mu\text{g}$  de la preparación final (etapa 4) del procedimiento de purificación de hexoquinasa A de cerebro de rata se sometieron a electroforesis (3 mA por columna), en geles de poliacrilamida al 7%, según se describió en **Materiales y Métodos**. El gel de la izquierda se incubó en el medio descrito para visualización de actividad enzimática. El gel de la derecha se incubó en negro de amida 0,2%, y el exceso de colorante se retiró por difusión en ácido acético 7%.

El peso molecular de la proteína, medido con la técnica de Hedrick y Smith (1968), fue de  $98.000 \pm 1.500$  ( $n=6$ , los datos experimentales no se muestran), valor que coincide con el encontrado, con otros procedimientos, en hexoquinasa A de cerebro de varios mamíferos (Redkar y Kenkare, 1972; Wilson, 1972; Chou y Wilson, 1972).

## OBTENCION Y CARACTERIZACION DEL SUERO INMUNE ANTI-HEXOQUINASA A DE RATA

Las preparaciones purificadas de hexoquinasa A de cerebro de rata fueron utilizadas para la inmunización de conejos según el protocolo descrito en **Materiales y Métodos**. El suero sanguíneo, generalmente sin purificación, de uno de los conejos se utilizó en los experimentos aquí comunicados. El suero de un conejo no inmunizado se utilizaba como control en todos los experimentos.

### 2.1. Efecto del suero inmune sobre la actividad enzimática de hexoquinasa A de cerebro

El suero inmune es capaz de disminuir la actividad enzimática de hexoquinasa A de rata, como se muestra en la Fig. 2 que resume 6 experimentos en los que se estudió el efecto de incubar cantidades variables de suero con cantidades fijas de enzima. Debe notarse que en experimentos con diferentes preparaciones de la isoenzima de rata (y en mayor grado con preparaciones de otras especies) es difícil ajustar la concentración de enzima de manera de utilizar siempre la misma cantidad. Generalmente se usaban entre 17 a 27 miliunidades de enzima (por conveniencia en el ensayo) y diluciones de suero que correspondían a volúmenes entre 0,1 y 1,25  $\mu$ l. Con el fin de corregir tales variaciones, la



abscisa de la Fig. 2, y otras subsiguientes, se expresa como  $\mu$ l de antisuero / unidad de enzima.

La línea continua de la Fig. 2 fue dibujada a ojo, y se la utilizará más adelante como elemento de comparación en experimentos con hexoquinasa de otros animales.

En experimentos diseñados para conocer el título del suero inmune se determinó que 1 ml de suero es capaz de neutralizar 34 unidades de enzima (Fig. 3).

La adición de suero inmune a las cubetas en que se medía la actividad de hexoquinasa A, de cerebro o de hígado, producía la inhibición casi instantánea de la reacción (no se muestra).

## 2.2. Doble inmunodifusión

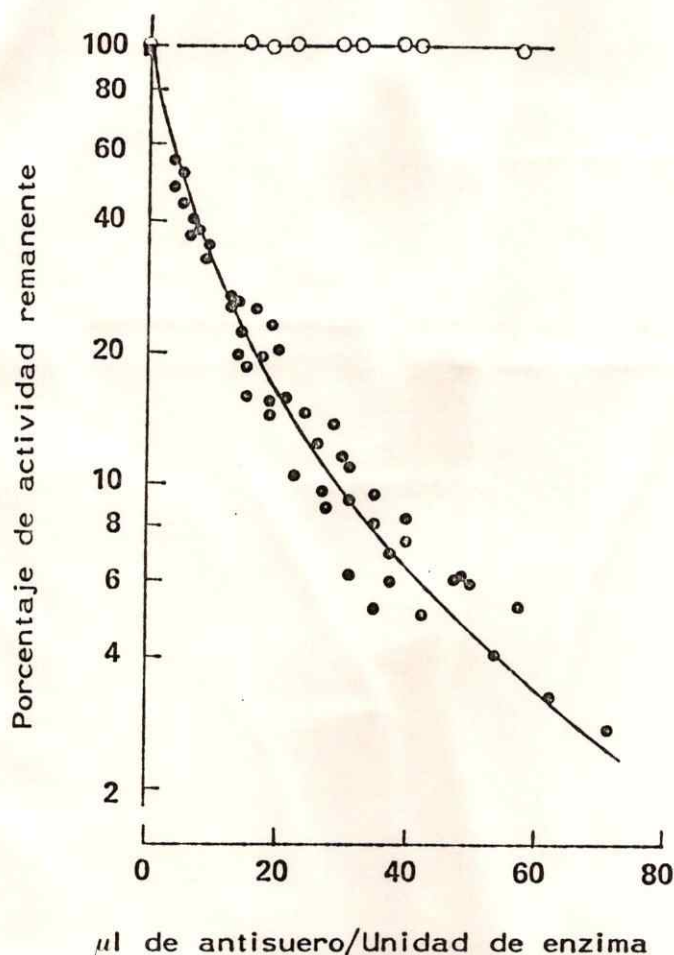
La inmunodifusión doble en placas de agarosa mostró que se produce una sola banda de precipitación entre suero inmune y hexoquinasa A de cerebro de rata, a diferentes concentraciones de uno u otro reaccionante. La línea de precipitación presenta actividad enzimática (Fig. 4).

La línea única de precipitación se observó también al utilizar preparaciones en diversas etapas de purificación. También en estos casos las líneas de precipitación presentaban actividad enzimática (Fig. 5).

Figura 2

EFFECTO DEL SUERO ANTI-  
HEXOQUINASA A SOBRE LA ACTIVIDAD  
DE HEXOQUINASA A DE CEREBRO  
DE RATA\*

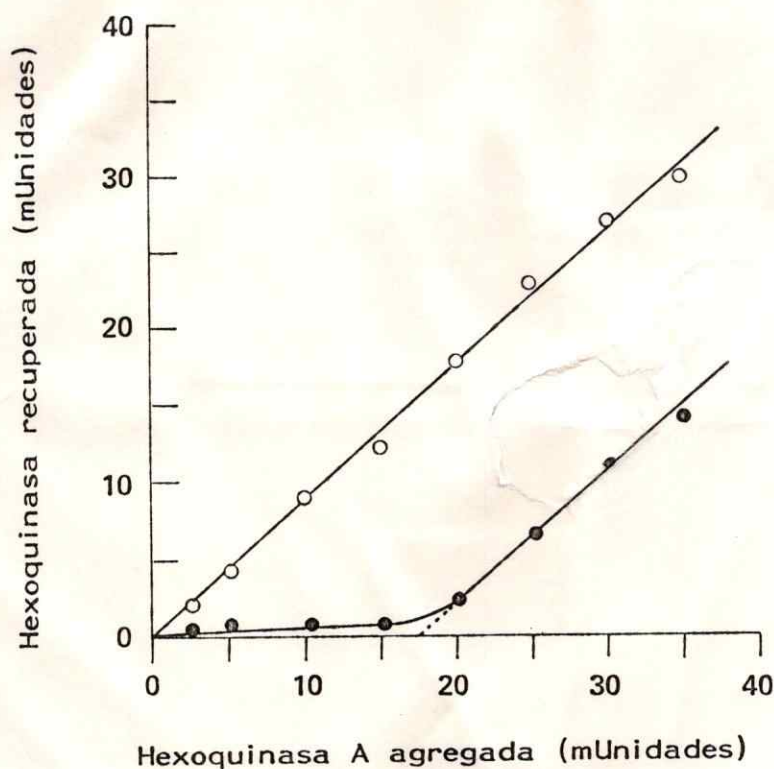
Efecto de la concentración de suero



\*Aproximadamente 20 mUnidades de hexoquinasa A pura se incubaron, durante 30 min a 30°, con cantidades variables (0,1 a 1,25  $\mu$ l) de suero inmune ( $\bullet$ ), o suero control de conejo no inmunizado ( $\circ$ ) en un volumen final de 0,2 ml. Luego se incubaron durante 18 h a 4°. Después de centrifugar, se determinó la actividad enzimática en los líquidos sobrenadantes. Para compensar las diferencias en la cantidad de enzima usada en diferentes experimentos, la abscisa se expresa como cociente entre cantidad de suero y la actividad de la enzima. La ordenada se expresa como porcentaje de la actividad remanente en los líquidos sobrenadantes con respecto a controles de tiempo cero de incubación ( $\blacksquare$ ) y controles incubados con suero control. La figura es un resumen de 6 experimentos diferentes.

Figura 3

TITULACION DEL SUERO INMUNE  
ANTI-HEXOQUINASA A CON  
HEXOQUINASA A DE CEREBRO DE RATA



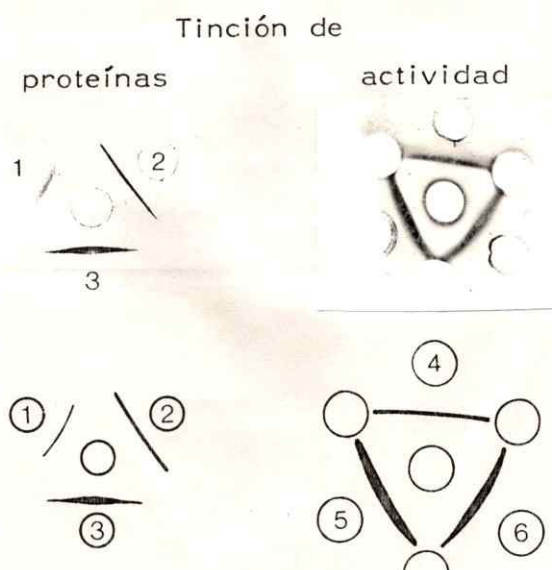
Cantidades variables (2,5 a 35 mU) de hexoquinasa A pura de cerebro de rata se incubaron con cantidades fijas (0,5  $\mu$ l, 34  $\mu$ g de proteína total) de suero inmune anti-hexoquinasa A (●), o de suero control de conejo no inmunizado (○) en un volumen final de 0,2 ml, durante 30 min a 30° y 18 h a 4°. El amortiguador usado para todas las diluciones era fosfato 10 mM pH 7, glucosa 10 mM, EDTA 1 mM. Los precipitados se descartaron por centrifugación a 1000 r.p.m durante 10 min y la actividad hexoquinásica se midió en los líquidos sobrenadantes.



Figura 4

ANALISIS POR INMUNODIFUSION DE LA  
REACCION ENTRE SUERO INMUNE Y  
HEXOQUINASA A DE CEREBRO DE RATA\*

Influencia de la concentración de enzima



\*Los pocillos centrales contenían 10  $\mu$ l ( $\sim$ 17  $\mu$ g de proteína total) de suero inmune. Los pocillos numerados contenían soluciones con diferentes cantidades, indicadas más abajo, de hexoquinasa A pura de cerebro de rata. Los pocillos no numerados no contenían muestra.

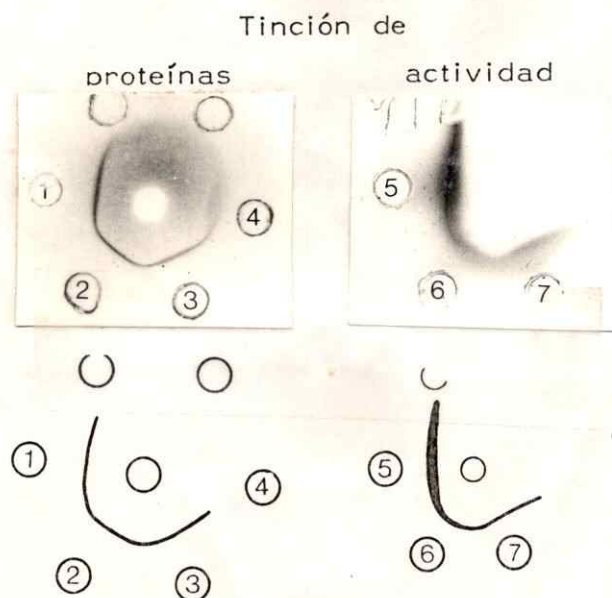
Las fotografías de las placas se muestran en la parte superior de la Fig. En la parte inferior se muestran esquemas dibujados a partir de las placas.

- |               |                        |
|---------------|------------------------|
| 1. 5 $\mu$ g  | 4. 10 $\mu$ g (0,56 U) |
| 2. 10 $\mu$ g | 5. 20 $\mu$ g (1,12 U) |
| 3. 20 $\mu$ g | 6. 20 $\mu$ g (1,12 U) |

Figura 5

ANALISIS POR INMUNODIFUSION DE LA  
REACCION ENTRE SUERO INMUNE Y  
HEXOQUINASA A DE CEREBRO DE RATA\*

Influencia del estado de purificación



\*Los pocillos centrales contenían  $10 \mu\text{l}$  ( $\sim 17 \mu\text{g}$  de proteína total) de suero inmune. Los pocillos numerados contenían soluciones de hexoquinasa A de cerebro de rata en diferentes estados de purificación, según se indica más abajo. Los pocillos no numerados no contenían muestra.

Las fotografías de las placas se muestran en la parte superior de la Fig. En la parte inferior se muestran esquemas dibujados a partir de las placas.

1. Etapa DEAE-celulosa,  $20 \mu\text{g}$
2. Etapa concentración,  $10 \mu\text{g}$
3. Etapa solubilización,  $20 \mu\text{g}$
4. Citosol de cerebro,  $10 \mu\text{g}$
5. Etapa concentración,  $10 \mu\text{g}$  (0,56 U)
6. Etapa DEAE-celulosa,  $10 \mu\text{g}$  (0,32 U)
7. Citosol de cerebro,  $10 \mu\text{g}$  (0,06 U)

### 2.3. Inmunolectroforesis

Por inmunolectroforesis se observó un solo arco de precipitación al utilizar hexoquinasa A pura o una preparación semipurificada de la enzima citosólica (Fig. 6).

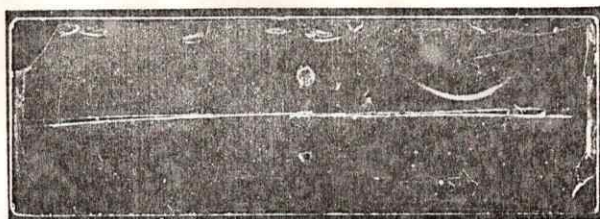
### 2.4. Retención de la actividad enzimática por inmunoadsorbentes

La preparación de dos columnas de matrices inmunoadsorbentes se describió en **Materiales y Métodos**. En la llamada columna control se ligó suero de conejo preinmune a Sepharose; en la llamada columna anti-HK se ligó suero inmune. A través de ambas columnas se filtraron preparaciones de hexoquinasa A pura de cerebro de rata. En los eluidos de la columna control se recuperaron  $98,6 \pm 0,4 \%$  de las unidades agregadas. En los eluidos de la columna anti-HK, en cambio, solo se encontraron  $1,6 \pm 0,2 \%$  de las unidades agregadas.



Figura 6

ANALISIS POR INMUNOELECTROFORESIS  
DE LA REACCION ENTRE SUERO INMUNE Y  
HEXOQUINASA A DE CEREBRO DE RATA



El procedimiento para la preparación de las placas, los amortiguadores utilizados y las condiciones de la electroforesis se describieron en **Materiales y Métodos**. El pocillo superior contenía 10  $\mu\text{g}$  (0,56 unidades) de hexoquinasa A de cerebro en la última etapa de purificación. El pocillo inferior contenía 20  $\mu\text{g}$  (0,1 unidades) de hexoquinasa A de citosol de cerebro parcialmente purificada por cromatografía en DEAE-celulosa. Después de la electroforesis se depositaron en la canaleta central 50  $\mu\text{l}$  de suero inmune. La inmunodifusión se desarrolló durante 48 h en cámara húmeda. Paralelamente se sometió al mismo procedimiento una placa control con suero control en la que no se observaron arcos de precipitación (no se muestra). Las placas fueron teñidas con negro de amida y el exceso de colorante retirado por difusión en ácido acético 7%. El arco inferior es apenas perceptible en la fotografía pero claramente detectable en la placa original.

## 3

**REACTIVIDAD INMUNOLOGICA CRUZADA  
DE LAS CUATRO HEXOQUINASAS DE RATA**

Con el objeto de estudiar la presencia de determinantes antigénicos comunes en las cuatro hexoquinasas presentes en la rata, las isoenzimas purificadas a partir de hígado se sometieron a las siguientes pruebas.

La incubación de cantidades variables de suero inmune con una cantidad fija de hexoquinasa A de hígado produjo desaparición de su actividad enzimática en igual magnitud que la producida por incubación con la enzima de cerebro. En cambio, la actividad de las hexoquinasas B, C o D no fue afectada por el suero inmune (Fig. 7).

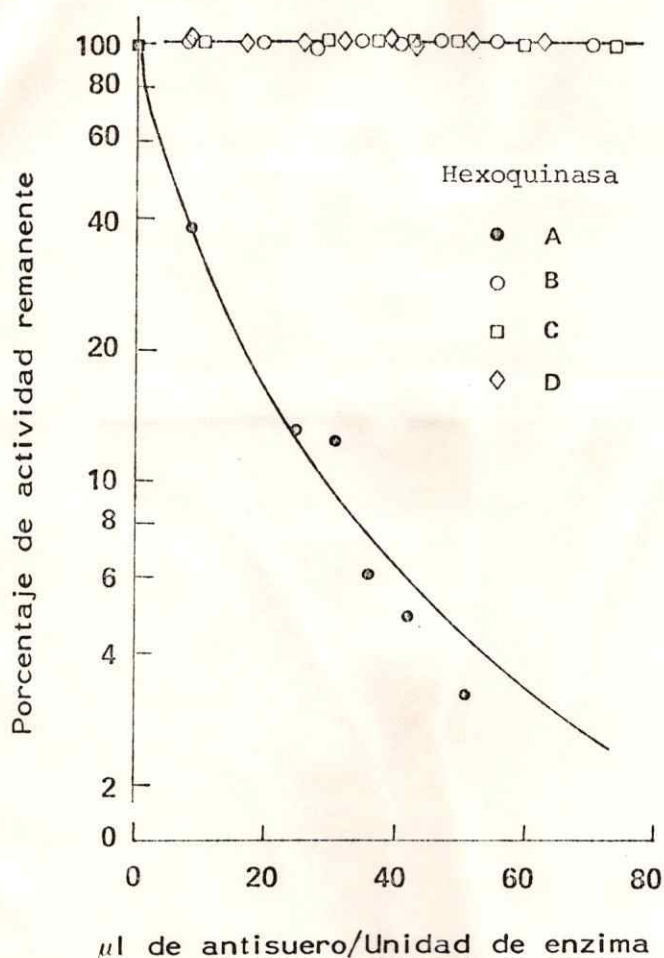
En experimentos de inmunoelectroforesis en los que se utilizó hexoquinasa A de cerebro y de hígado se observaron arcos de precipitación de idéntica movilidad (Fig. 8).

En placas de doble inmunodifusión (Fig. 9) se observó una banda de precipitación continua frente a pocillos adyacentes que contenían hexoquinasa A de cerebro o de hígado. La banda poseía actividad enzimática. No se observaron bandas de precipitación frente a los pocillos que contenían hexoquinasas B, C, o D.

Figura 7

EFFECTO DEL SUERO ANTI-HEXOQUINASA A  
SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS  
HEXOQUINASAS A, B, C y D DE HIGADO  
DE RATA

Efecto de la concentración de suero

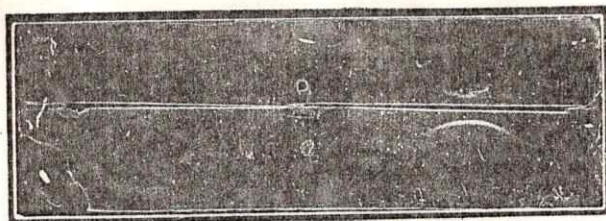


Alícuotas que contenían hexoquinasa A (●), B (○), C (□) o D (◇), (17 a 21 mUnidades) semipurificadas a partir de hígado de rata, por cromatografía en DEAE-celulosa, se incubaron durante 30 min a 30° con cantidades variables (0,1 a 1,25 μl) de suero inmune, en un volumen final de 0,2 ml. Luego se incubaron durante 18 h a 4°. Después de centrifugar, se determinó la actividad enzimática en los líquidos sobrenadantes. Como controles se usaron mezclas no incubadas (■) y mezclas que contenían suero control o amortiguador A en reemplazo del suero inmune. Las actividades enzimáticas en los controles no diferían entre sí y corresponden al 100% de actividad remanente. Simultáneamente se ensayaron mezclas que contenían hexoquinasa A de cerebro en vez de las isoenzimas de hígado. Esas mediciones no se incluyen en la figura porque están representadas en la curva de trazo grueso que es la misma de la Fig. 2.



Figura 8

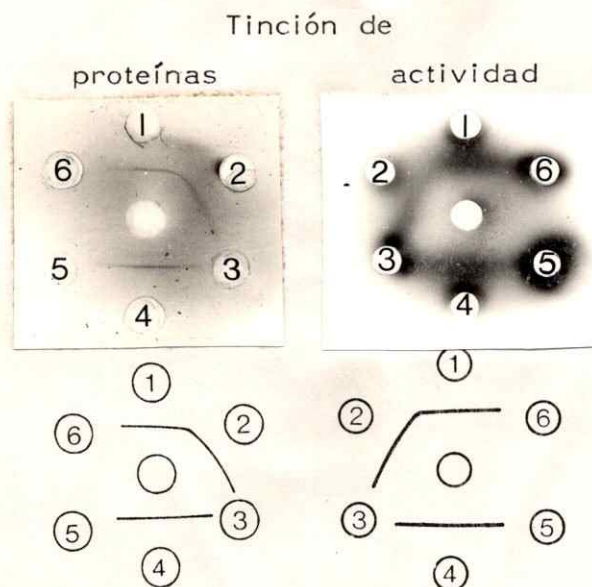
ANALISIS POR INMUNOELECTROFORESIS  
DE LA REACCION ENTRE SUERO INMUNE  
Y HEXOQUINASA A DE CEREBRO O DE HIGADO



El procedimiento para la preparación de las placas, los amortiguadores usados y las condiciones de la electroforesis se describieron en **Materiales y Métodos**. El pocillo superior contenía 30  $\mu\text{g}$  (0,2 unidades) de hexoquinasa A de citosol de hígado parcialmente purificada por cromatografía en DEAE-celulosa. El pocillo inferior contenía 10  $\mu\text{g}$  (0,56 unidades) de hexoquinasa A de cerebro en la última etapa de purificación. Después de la electroforesis se depositaron en la canaleta central 50  $\mu\text{l}$  de suero inmune. La inmunodifusión se desarrolló durante 48 h en cámara húmeda. Paralelamente se sometió al mismo procedimiento una placa control con suero de conejo no inmunizado en la que no se observaron arcos de precipitación (no se muestra). Las placas se tiñeron con negro de amida y el exceso de colorante retirado por difusión en ácido acético 7%.

Figura 9

ANALISIS POR INMUNODIFUSION DE LA REACCION ENTRE SUERO INMUNE ANTI-HEXOQUINASA A DE CEREBRO Y LAS HEXOQUINASAS A, B, C Y D DE HIGADO DE RATA\*



\*Los pocillos centrales contenían 10  $\mu$ l (~17  $\mu$ g de proteína total) de suero inmune. Los pocillos numerados contenían 10  $\mu$ g (proteína total) de diferentes hexoquinasas como se indica más abajo. Las hexoquinasas fueron aisladas por cromatografía en DEAE-celulosa.

Las fotografías de las placas se muestran en la parte superior de la Fig. En la parte inferior se muestran esquemas dibujados a partir de las placas.

1. Hexoquinasa A pura de cerebro (0,45 U)
2. Hexoquinasa A de hígado (0,4 U)
3. Hexoquinasa B de hígado (0,45 U)
4. Hexoquinasa A pura de cerebro (0,45 U)
5. Hexoquinasa C de hígado (0,45 U)
6. Hexoquinasa D de hígado (0,38 U)

Finalmente, se estudió la capacidad de las columnas de inmuno-adsorbente de retener a las hexoquinasa de hígado de rata, en experimentos similares a los ya descritos. También en este caso se observó que la hexoquinasa A de hígado se comporta esencialmente igual que la enzima de cerebro ya que solo 1,6% de la actividad fue recuperada en la columna anti-HK. Las hexoquinasas B, C o D no fueron retenidas (Tabla III), aún cuando en el caso de hexoquinasa B se encontró una retención de 16,5 % que no difiere de la observada en la columna control ( $p > 0,25$ ).

Estos resultados indican que el suero inmune no distingue entre hexoquinasa A de cerebro y de hígado de rata, las que aparecen como inmunológicamente idénticas. El suero inmune solo reconoce a hexoquinasa A cuyos determinantes antigénicos parecen no ser compartidos por las hexoquinasas B, C o D.



Tabla III

Inmunoabsorción de las hexoquinasa A, B, C o D de hígado de rata por suero inmune o suero control ligados a Sepharose\*

Hexoquinasa	Columna control	Columna anti-HK
<i>% de actividad recuperada</i>		
A (3)	93,1 ± 0,6	1,6 ± 0,06
B (5)	94,2 ± 1,7	83,5 ± 4,1
C (3)	98,3 ± 0,8	95,5 ± 2,2
D (4)	98,4 ± 1,1	97,8 ± 1,2

\*La preparación y manejo de las columnas inmuno-adsorbentes se describió en **Materiales y Métodos** y en el Anexo 1. Alícuotas que contenían entre 70 y 80 mUnidades de hexoquinasa semipurificadas de hígado de rata se sembraron en columnas control (suero de conejo no inmunizado) y en columnas anti-HK (suero inmune). Después de eluir con amortiguador borato-NaCl (pH 8,6) se midió la actividad enzimática no retenida en las columnas. Los resultados se expresan como porcentaje ± E.S. de la actividad recuperada en los eluidos con respecto a la actividad sembrada en las columnas. Los números entre paréntesis indican el número de experimentos realizados.

## REACTIVIDAD INMUNOLOGICA CRUZADA DE HEXOQUINASA A DE MAMIFEROS

El suero inmune anti-hexoquinasa A de rata se utilizó para investigar los cambios estructurales que esta isoenzima puede haber sufrido durante la evolución de los vertebrados. Por conveniencia en la presentación se mostrarán los resultados de acuerdo con la técnica inmunológica usada para medir el grado de reacción cruzada.

### 4.1. Efecto del suero inmune sobre la actividad enzimática

En estos experimentos se incubaban cantidades variables de suero (entre 0,1 a 1,25  $\mu$ l) con cantidades fijas de hexoquinasa A de cerebro de varios mamíferos (alrededor de 20 mU) purificadas mediante el procedimiento de Chou y Wilson (1972). Las incubaciones se hacían a 30° durante 1 h y luego durante la noche a 4°, según se indicó en **Materiales y Métodos**. En todos los experimentos se incluían incubaciones de la hexoquinasa en estudio con suero control de conejo no inmunizado, y de hexoquinasa A de rata con suero no inmune y con suero inmune.

En la Fig. 10 izquierda, se muestra el grado de inmunoprecipitación que el anticuerpo produce en la actividad de hexoquinasas

A aislada de varios roedores. Si bien la actividad de las enzimas de todas las especies estudiadas se redujo por incubación con el anticuerpo, el efecto fue pequeño comparado con el producido sobre la enzima de rata (línea cortada gruesa de la Fig. 10). La hexoquinasa de ratón fue la más afectada, pero se requería cinco veces más suero para alcanzar 50% de desaparición de la actividad hexoquinásica, en comparación con la enzima homóloga. En el caso de las enzimas aisladas de degu, hamster, Akodon, Phyllotis y cuy, el efecto fue aún menor requiriéndose, en comparación con la enzima de rata, ~10 veces más suero para reducir la actividad en 50%.

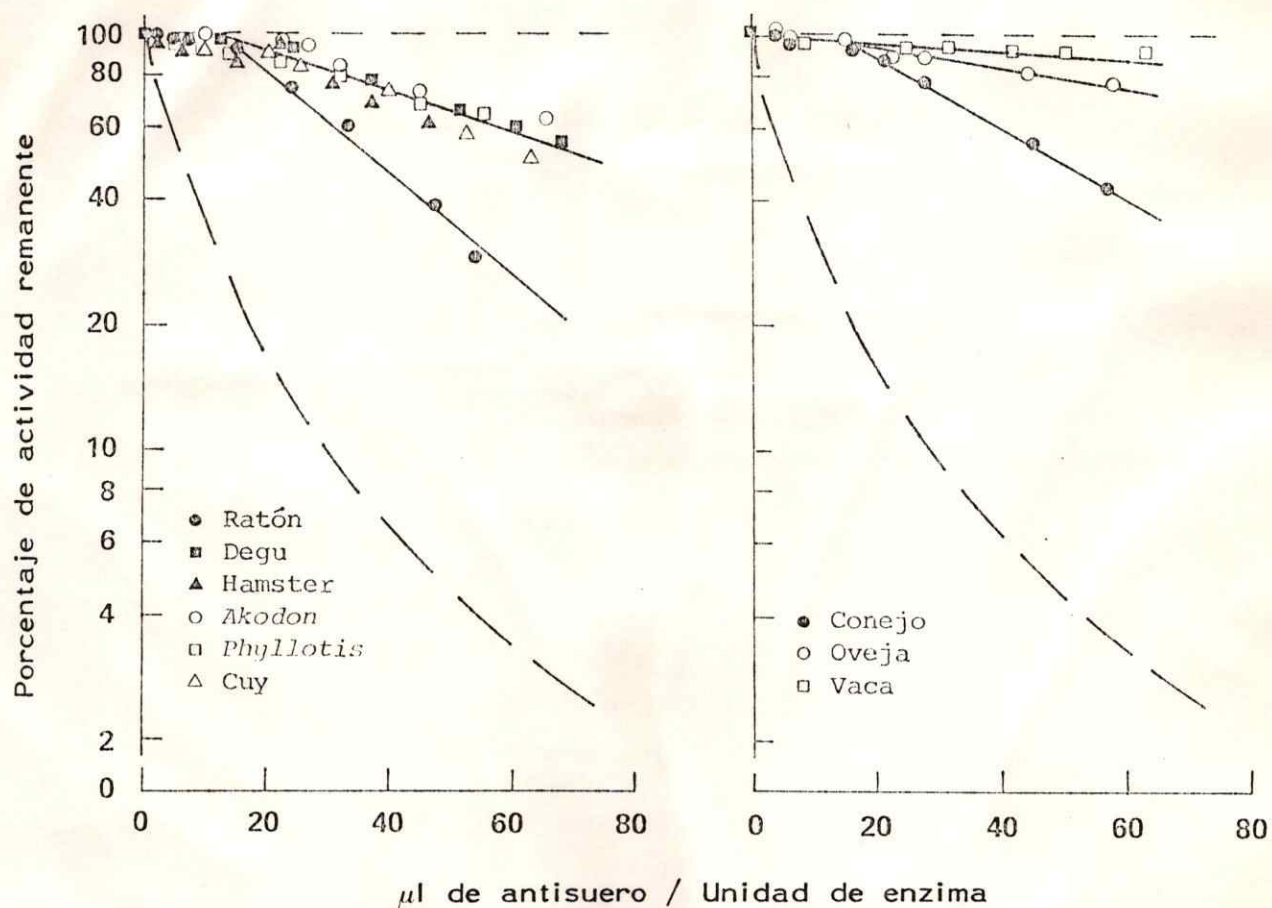
Al estudiar mamíferos que no pertenecen al Orden Rodentia se observó aún menor precipitación (Fig. 10, derecha). Las enzimas de oveja y de bovino requerían ~12 y ~15 veces mayor cantidad de anticuerpo en relación con la reacción homóloga. La enzima de conejo mostró una mayor reactividad situándose en una posición intermedia entre ratón y los otros roedores estudiados.



Figura 10

EFFECTO DEL SUERO ANTI-HEXOQUINASA A DE RATA  
SOBRE LA ACTIVIDAD DE HEXOQUINASA A DE VARIOS MAMIFEROS

Efecto de la concentración de suero



Aproximadamente 20 mUnidades de hexoquinasa A de cerebro de los mamíferos indicados se incubaron con cantidades variables (0,1 a 1,25  $\mu$ l) de suero inmune anti-hexoquinasa A de rata, exactamente en las condiciones descritas en **Materiales y Métodos** y usando controles idénticos a los especificados en la leyenda de la Fig. 7. Simultáneamente se ensayaron mezclas que contenían hexoquinasa A de rata. Esas mediciones no se muestran en la figura porque están representadas por la línea gruesa cortada que es la misma de la Fig. 2. En la parte izquierda se han agrupado los resultados obtenidos con la enzima aislada de roedores; a la derecha se muestran los obtenidos con la enzima de otros mamíferos.

#### 4.2. Retención por columnas inmunoabsorbentes

Preparaciones de hexoquinasa A aisladas de rata, ratón, hamster, degu, conejo o vaca fueron filtradas a través de las columnas inmunoabsorbentes descritas en **Materiales y Métodos**, y la actividad enzimática recuperada se expresó como porcentaje de la actividad sembrada (Tabla IV). En la columna control se recuperaba prácticamente toda la actividad. En cambio, se observó retención casi completa de la actividad de las enzimas de las fuentes mencionadas en la columna anti-HK. Esta conducta sugiere conservación de los determinantes antigénicos responsables de la unión de la enzima con los anticuerpos.

Tabla IV

Inmunoabsorción de hexoquinasa A de cerebro de varios mamíferos por suero inmune o suero control ligados a Sepharose\*

Hexoquinasa	Columna control	Columna anti-HK
	<i>% de actividad recuperada</i>	
Rata	98,6 ± 0,4	1,6 ± 0,2
Ratón	96,2 ± 1,9	6,2 ± 0,7
Hamster	98,1 ± 0,7	5,9 ± 0,7
Degu	97,6 ± 0,6	6,9 ± 0,5
Conejo	97,0 ± 1,4	3,0 ± 0,8
Vaca	99,5 ± 0,4	12,7 ± 2,8

\*La preparación y manejo de las columnas inmuno-adsorbentes se describió en **Materiales y Métodos** y en el Anexo 1. Alícuotas que contenían entre 70 y 80 mUnidades de hexoquinasa A purificadas de cerebro de los mamíferos indicados se sembraron en columnas control (suero de conejo no inmunizado) y en columnas anti-HK (suero inmune). Después de eluir con amortiguador borato-NaCl (pH 8,6) se midió la actividad enzimática no retenida en las columnas. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad recuperada en los eluidos con respecto a la actividad sembrada en las columnas y corresponden al promedio ± E.S de tres experimentos.



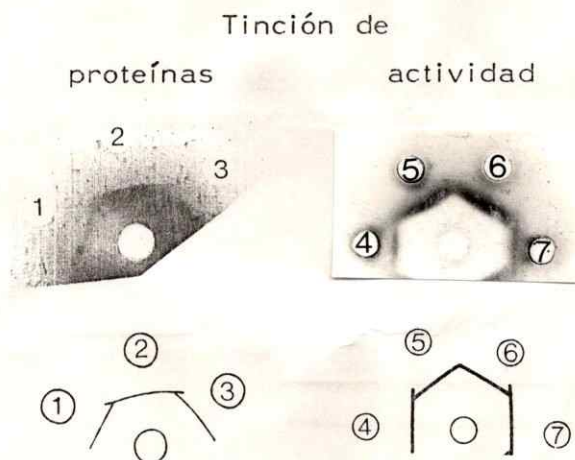
#### 4.3. Experimentos de doble inmunodifusión

El grado de reacción cruzada entre hexoquinasa A de rata y hexoquinasas A aisladas de diversos mamíferos se estudió en placas de doble inmunodifusión (Figs. 11 a 15). Con todas las enzimas estudiadas, en pocillos adyacentes a los de hexoquinasa A de rata, se observaron líneas de precipitación con espolones más o menos marcados tanto en placas teñidas para proteínas como en las teñidas para actividad enzimática. En el caso de la hexoquinasa A de ratón (Fig. 11), animal que también pertenece a la Familia Muridae, se observaron espolones pequeños.

Con las enzimas aisladas de roedores cricétidos (Fig. 12) u octodóntidos (Fig. 13), la longitud de los espolones es mayor, y se hacen aún más prominentes en el caso de las enzimas de mamíferos fuera del Orden Rodentia, como en el conejo (Fig. 14) o en artiodáctilos rumiantes en los que los espolones son significativamente mayores (Fig. 15).

Figura 11

ANALISIS POR INMUNODIFUSION DE LA  
REACCION CRUZADA ENTRE LAS HEXO-  
QUINASAS A DE RATA Y DE RATON  
(Mus musculus)\*



\*Los pocillos centrales contenían 10  $\mu$ l ( $\sim$ 17  $\mu$ g de proteína total) de suero inmune. Los pocillos laterales contenían 10  $\mu$ g ( $\sim$ 0,5 U) de hexoquinasa A purificada de cerebro de rata o de ratón, como se indica más abajo.

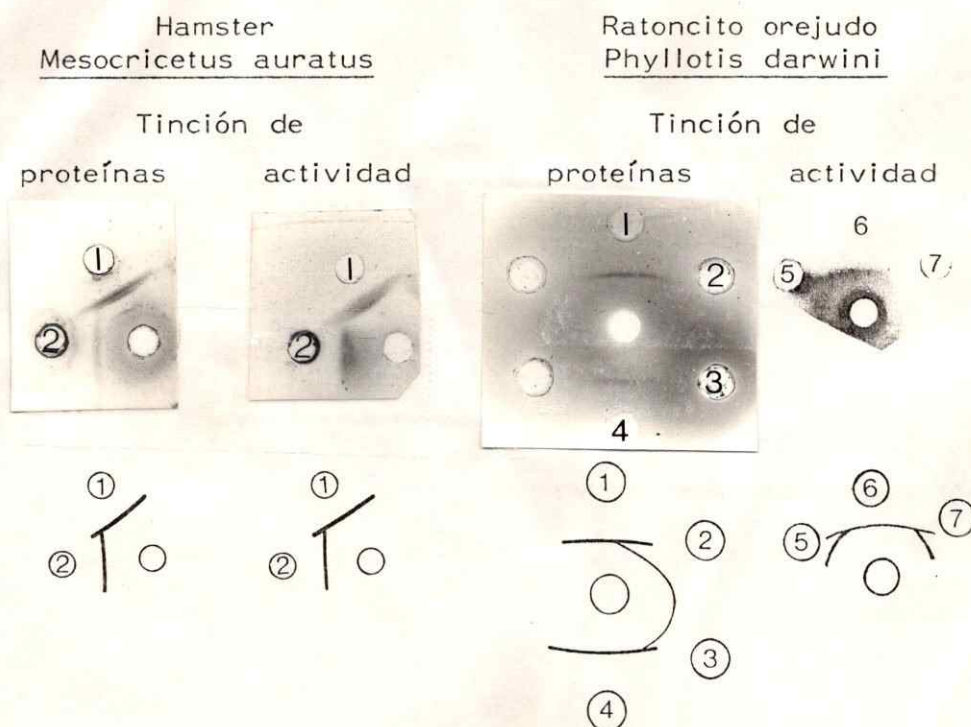
Las fotografías de las placas se muestran en la parte superior de la Fig. En la parte inferior se muestran esquemas dibujados a partir de las placas.

Pocillos 1, 3, 5 y 6: Hexoquinasa A de cerebro de ratón.

Pocillos 2, 4 y 7: Hexoquinasa A de cerebro de rata.

Figura 12

ANALISIS POR INMUNODIFUSION DE LA REACCION  
CRUZADA ENTRE HEXOQUINASAS A DE ROEDORES  
CRICETIDOS Y DE RATA\*



\*Los pocillos centrales contenían 10  $\mu$ l ( $\sim$ 17  $\mu$ g de proteína total) de suero inmune. Los pocillos laterales contenían hexoquinasa A de rata (0,5 U), hamster (0,5 U) o ratoncito orejudo ( $\sim$ 0,2 U), como se enumera más abajo.

Las fotografías de las placas se muestran en la parte superior de la Fig. En la parte inferior se muestran esquemas dibujados a partir de las placas.

Los pocillos laterales contenían hexoquinasa A de roedores, como sigue:

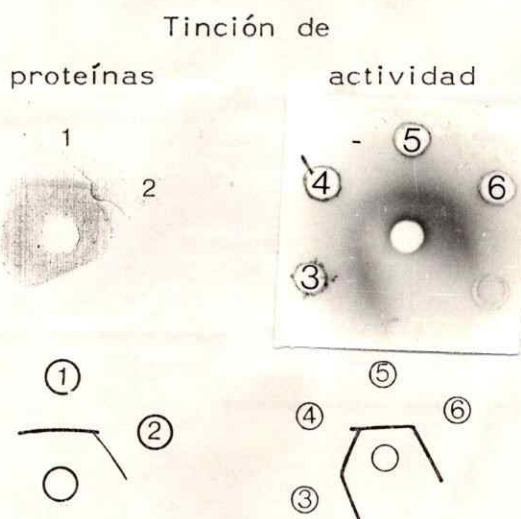
Izquierda: 1, Rata (10  $\mu$ g); 2, Hamster (8  $\mu$ g).

Derecha: 1, 4 y 6, Rata (10  $\mu$ g);  
2, 3, 5 y 7, Ratoncito orejudo (6, 10, 8 y 5  $\mu$ g, respectivamente).



Figura 13

ANALISIS POR INMUNODIFUSION DE LA  
REACCION CRUZADA ENTRE LAS HEXO-  
QUINASAS A DE RATA Y DE DEGU  
(Octodon degus)\*



\*Los pocillos centrales contenían 10  $\mu$ l ( $\sim$ 17  $\mu$ g de proteína total) de suero inmune. Los pocillos laterales contenían hexoquinasa A purificada de cerebro de rata o de degu, como se indica más abajo.

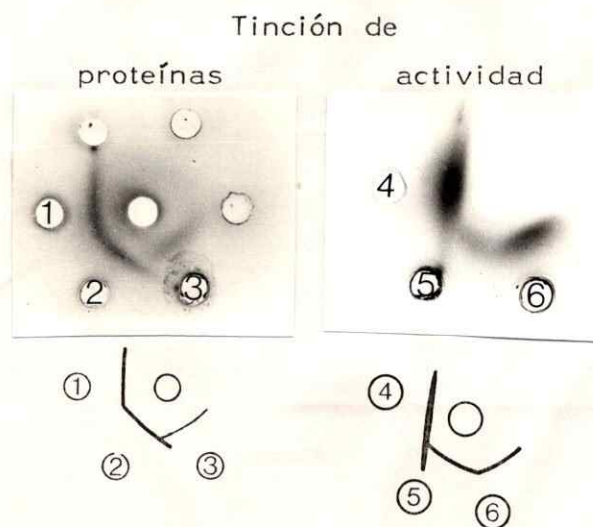
Las fotografías de las placas se muestran en la parte superior de la Fig. En la parte inferior se muestran esquemas dibujados a partir de las placas.

Pocillos 1, 5 y 6: Hexoquinasa A de cerebro de rata (10  $\mu$ g, 0,5 U).

Pocillos 2, 3, y 4: Hexoquinasa A de cerebro de degu (8  $\mu$ g, 0,4 U).

Figura 14

ANALISIS POR INMUNODIFUSION DE LA  
REACCION CRUZADA ENTRE LAS HEXO-  
QUINASAS A DE RATA Y DE CONEJO  
(Oryctolagus cuniculus)\*



\*Los pocillos centrales contenían 10  $\mu$ l ( $\sim$ 17  $\mu$ g de proteína total) de suero inmune. Los pocillos laterales contenían 10  $\mu$ g (0,5 unidades) de hexoquinasa A purificada de cerebro de rata o de conejo, como se indica más abajo.

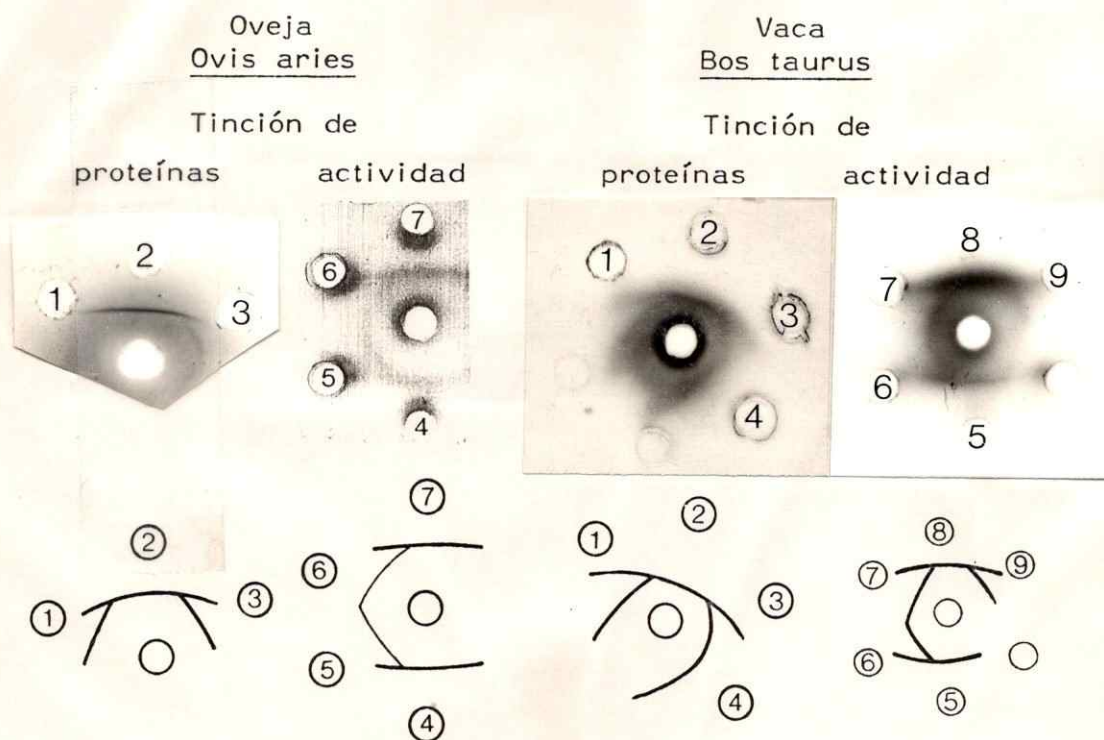
Las fotografías de las placas se muestran en la parte superior de la Fig. En la parte inferior se muestran esquemas dibujados a partir de las placas.

Pocillos 1, 2 y 4: Hexoquinasa A de cerebro de rata.

Pocillos 3, 5 y 6: Hexoquinasa A de cerebro de conejo.

Figura 15

ANALISIS POR INMUNODIFUSION DE LA REACCION  
CRUZADA ENTRE HEXOQUINASAS A DE ARTIODACTILOS  
RUMIANTES Y DE RATA\*



\*Los pocillos centrales contenían 10  $\mu$ l ( $\sim$ 17  $\mu$ g de proteína total) de suero inmune. Los pocillos laterales contenían hexoquinasa A de rata, oveja o vaca, como se enumera más abajo.

Las fotografías de las placas se muestran en la parte superior de la Fig. En la parte inferior se muestran esquemas dibujados a partir de las placas.

Los pocillos laterales contenían hexoquinasa A de rata o rumiantes, como sigue:

Izquierda: 1, 3, 5 y 6: Oveja (10  $\mu$ g, 0,5 U).

2, 4 y 7: Rata (10  $\mu$ g, 0,56 U).

Derecha: 1, 3, 4, 6, 7 y 9: Vaca (8  $\mu$ g, 0,5 U; excepto 9: 0,25 U)

2, 5 y 8: Rata (10  $\mu$ g, 0,56 U).



#### 4.4. Microfijación del complemento

En estos experimentos es importante demostrar una relación lineal entre el valor máximo de la curva de fijación y la concentración de antisuero. La relación está dada por la ecuación (Champion et al., 1974):

$$Y = m \log X + b$$

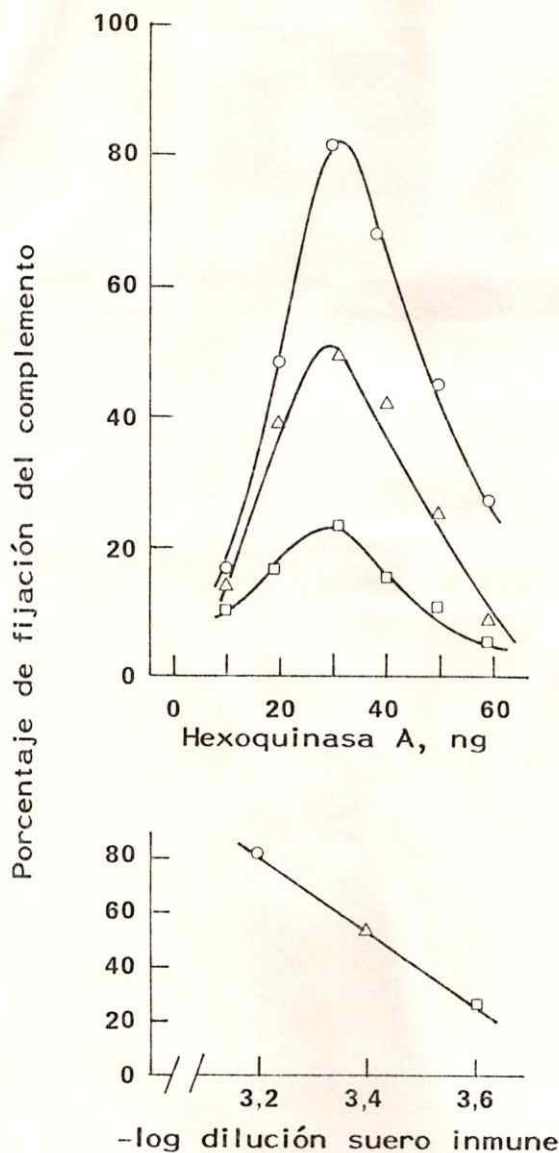
en que  $Y$  = fijación máxima de complemento,  $x$  = concentración de antisuero y  $b$  = intersección en  $Y$ . Esta relación se cumple en todos los sistemas estudiados (ver referencias en Champion et al., 1974), incluyendo los experimentos que se muestran en esta Tesis (Fig. 16)

Los experimentos de microfijación del complemento con suero antihexoquinasa A de rata y hexoquinasas A aisladas de cerebro de varios mamíferos (Fig. 17) mostraron que las hexoquinasas de roedores son similares, con excepción de la enzima de hamster. En cambio, la hexoquinasa A de oveja y vaca aparecen poco relacionadas con la enzima de rata puesto que la magnitud de la fijación era mucho menor y se requerían cantidades apreciablemente mayores de enzima (Fig. 17, derecha). La hexoquinasa A de conejo presentó reactividad similar a la enzima de hamster.

Figura 16

MICROFIJACION DEL COMPLEMENTO  
 POR LA REACCION HEXOQUINASA A  
 vs SUERO ANTI-HEXOQUINASA A

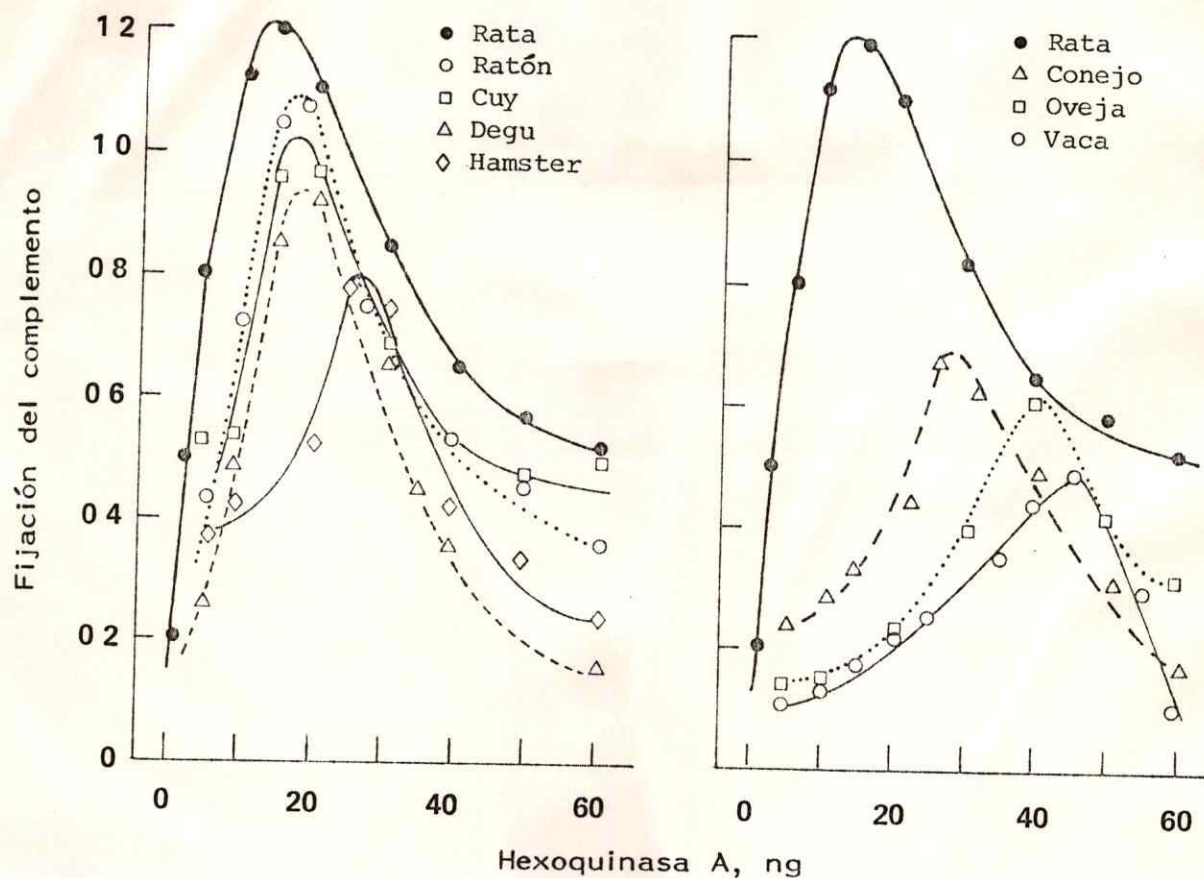
Efecto de la dilución de antisuero



Validación de las condiciones usadas para la microfijación de complemento por la reacción inmune anti-hexoquinasa A-hexoquinasa A. En la figura superior se muestra el efecto de la concentración de antígeno a tres concentraciones de antisuero: dilución 1/1600  $\circ$ ; 1/2500  $\Delta$ ; 1/4000  $\square$ . En la figura inferior se muestra la relación entre porcentaje máximo de fijación del complemento observado con cada concentración de antisuero vs  $-\log$  de la dilución de suero. Los datos provienen del experimento de la figura superior. El valor de la pendiente es 150, valor similar al encontrado en otros sistemas inmunes (Champion et al., 1974).

Figura 17

MICROFIJACION DEL COMPLEMENTO POR ANTI-HEXOQUINASA A  
Y HEXOQUINASA A DE VARIOS MAMIFEROS\*



\*Las mezclas de reacción (en triplicado) contenían 0,1 ml de suero inmune (dilución 1/1600), cantidades variables de antígeno (desde 1 a 60 ng), complemento y sistema hemolítico en un volumen final de 0,7 ml. La disposición de los tubos, la naturaleza de los controles y el detalle experimental se describió en **Materiales y Métodos** y en el Anexo 3. La fijación del complemento se expresa como la diferencia de absorbancia entre tubo control sin suero inmune y el sistema completo. Cada punto corresponde al promedio de las lecturas de los triplicados.



La técnica de microfijación del complemento puede cuantificar el grado de reacción cruzada entre las enzimas consideradas. Para ello, sin embargo, deben cumplirse algunas condiciones, como por ejemplo, la medición del grado de fijación de complemento a varias concentraciones de suero inmune para cada una de las enzimas. En nuestro caso solo se estudió de esa manera la hexoquinasa de rata (Fig. 16). Aún así, suponiendo que tales mediciones hubieran coincidido con la pendiente de la línea de la Fig. 16, inferior (como por lo demás ocurre en todos los sistemas estudiados, véase por ejemplo, Seal et al., 1970; Champion et al., 1975; Prager et al., 1971, 1978), es posible establecer, provisoriamente, para las enzimas estudiadas, el parámetro Distan-  
cia inmunológica (D.I.) según la ecuación:

$$D.I. = \log I.D. \times 100$$

y

$$\log I.D. = \frac{Y_H - Y_h}{m} + \log \frac{X_h}{X_H}$$

en que  $Y_H$  es el porcentaje máximo de complemento fijado con antígeno homólogo;  $Y_h$  es el porcentaje máximo de complemento fijado con antígeno heterólogo;  $X_H$  es la concentración de antisuero utilizada con antígeno homólogo;  $x_h$  es la concentración de antisuero utilizado con antígeno heterólogo; y  $m$  es la pendiente de la Fig. 16, inferior (véase p. 47)

Las distancias inmunológicas aparentes así obtenidas se muestran en la Tabla V.

Por las razones anotadas anteriormente, estos valores deben considerarse provisionales. Por ello, hemos resistido a la tentación de convertir los valores de la Tabla V en predicciones de diferencia de secuencia, dada la correlación satisfactoria que se ha observado cuando las reacciones de microfijación del complemento se han realizado con proteínas de secuencia conocida (Prager et al., 1971, 1978). Aún otra razón para tal abstención la constituye el que, idealmente, los valores de distancia inmunológica debieran obtenerse con reacciones en doble dirección, es decir, por ejemplo, con comparaciones anti-HK<sub>rata</sub> vs HK<sub>ratón</sub> y anti-HK<sub>ratón</sub> vs HK<sub>rata</sub>.

Aún así, los valores de la Tabla V muestran la correlación esperada entre el grado de reacción cruzada de las diversas enzimas y el parentesco generalmente aceptado por los zoólogos, con la excepción del hamster que por pertenecer a la familia Cricetidae debiera presentar un valor de distancia inmunológica entre 6 y 12.

Tabla V

Distancias inmunológicas  
aparentes entre hexoquinasas A  
de varios mamíferos\*

---

Especie	Distancia inmunológica
Rata	1,0
Ratón	5,4
Cuy	12,3
Degu	14,1
Hamster	21,0
Conejo	28,0
Oveja	31,0
Vaca	37,7

---

\*Las distancias inmunológicas fueron calculadas a partir de los experimentos de microfijación de complemento (Figs. 16 y 17), usando las ecuaciones descritas en el texto.



## DISCUSION

### Características del suero inmune anti-hexoquinasa A de rata

El suero inmune producido en conejo por inyección repetida de hexoquinasa A de cerebro de rata, es monoespecífico ya que se observó una sola línea de precipitación, tanto en inmunodifusión como en inmunoelectroforesis, al enfrentar suero con el antígeno puro o con preparaciones crudas o semipurificadas. Mas aún, la línea de precipitación observada en placas de inmunodifusión mostraba actividad fosforilante de glucosa lo que, por una parte, confirma su identidad y, muestra adicionalmente, que el complejo antígeno-anticuerpo retiene, al menos parcialmente, la actividad enzimática del antígeno.

El suero es capaz de disminuir la actividad enzimática de hexoquinasa A de cerebro de rata y si está ligado a una matriz de Sepharose es capaz de retener cuantitativamente la actividad de hexoquinasa A.

### Relaciones inmunológicas de las cuatro hexoquinasas de rata

El suero inmune anti-hexoquinasa A de cerebro no fue capaz de reconocer a las hexoquinasas B, C o D semipurificadas de hígado de rata, pero sí a la hexoquinasa A de la misma fuente, tanto por su efecto sobre la actividad (Fig. 7), como en inmunoelectroforesis (Fig. 8), inmunodifusión (Fig. 9), o en columna de

inmunoabsorbente (Tabla III). Estos resultados indican que la hexoquinasa A de rata presenta los mismos determinantes antigénicos cualquiera sea el órgano de la cual se extrae. Por el contrario, las hexoquinasas B, C y D parecen no compartir determinantes antigénicos comunes con hexoquinasa A. Estos resultados confirman y profundizan los obtenidos por Craven y Basford (1969) quienes comunicaron que un suero de conejo anti-hexoquinasa A de cerebro de bovino no era capaz de afectar la actividad de las hexoquinasas B, C o D de rata. Creighton et al. (1972) utilizando un suero de conejo anti-hexoquinasa B parcialmente purificado de músculo de rata, solo observaron inhibición del antígeno homólogo. Las actividades de hexoquinasa A de cerebro o de tejido adiposo o hexoquinasa D de hígado no fueron afectadas. Igualmente, Neumann y Pflleiderer (1974) y Neumann et al. (1974) no encontraron precipitación de hexoquinasa C humana por un suero inmune anti-hexoquinasa A de la misma especie. El suero anti-hexoquinasa C tampoco reconocía a hexoquinasa A. Ouchi e Ishibashi (1975) observaron que un suero de conejo anti-hexoquinasa A de rata no inhibía la actividad de hexoquinasa B de músculo o C de bazo de rata. Lawrence et al. (1983) con un suero inmune anti-hexoquinasa A de rata, preparado en oveja, no observaron inmunoinhibición ni líneas de precipitación en experimentos de doble difusión con hexoquinasa B o D.

Muy recientemente, Lawrence et al. (1983) utilizando sueros anti-hexoquinasas A, B y D no lograron encontrar (por inmunodifusión) reacción cruzada de hexoquinasa A con suero anti-hexoquinasa B o anti-hexoquinasa D. Tampoco observaron reacción cruzada entre hexoquinasa B o D con el suero anti-hexoquinasa A. En cambio encontraron reacción cruzada significativa entre las hexoquinasas B y D.

Se ha obtenido en este laboratorio un suero inmune de ratón anti-hexoquinasa C de rata (Jasna Radojković y Tito Ureta, comunicación personal) y un suero de conejo anti-hexoquinasa D de rata (Toro, 1982), con los cuales podrá estudiarse el interesante problema de las relaciones estructurales entre las cuatro hexoquinasas.

Otros sistemas isoenzimáticos también muestran ausencia de reacción inmunológica cruzada entre sus componentes, como por ejemplo (por citar solo algunas), las lactato-deshidrogenasas  $A_4$  y  $B_4$  (Nisselbaum y Bodansky, 1961; Rajewsky et al., 1964; Pesce et al., 1964; Bailey y Wilson, 1968; Holmes y Scopes, 1974), las aldolasas A, B y C (Rutter et al., 1968), las creatina-quinasas MM y BB (Dawson et al., 1968), las fosfofructoquinasas M y L (Dunaway, 1983) y las piruvato-quinasas L y M (Tanaka et al., 1967; Chatterton et al., 1982).



### Consideraciones acerca de la estructura de las hexoquinasa

La falta de reacción inmunológica cruzada de las hexoquinasa B, C y D con el suero anti-hexoquinasa A es una conclusión importante. En efecto, las cuatro isoenzimas fosforilantes de glucosa parecen muy relacionadas no solo por sus características catalíticas (Ureta et al., 1979; Pollard-Knight y Cornish-Bowden, 1982) sino también por sus estructuras. En efecto, la comparación de las composiciones de aminoácidos de algunas hexoquinasa de mamíferos mediante el índice  $S\Delta n$  propuesto para inferir similitud de estructura primaria y validado por examen de ese parámetro en proteínas de secuencia conocida (Cornish-Bowden, 1977) revela que las hexoquinasa A, B y D de vertebrados son proteínas relacionadas estructuralmente, ya que los valores de  $S\Delta n$  son significativamente menores que los que predice la similitud por azar (Ureta, 1982).

El parecido estructural entre hexoquinasa A y las hexoquinasa B y D (por inferencia también con hexoquinasa C) no se compadece con la ausencia de reacción cruzada de esas hexoquinasa con el suero inmune anti-hexoquinasa A. Es necesario entonces postular que los determinantes antigénicos de hexoquinasa A están situados en sitios superficiales de la molécula, región en la cual probablemente se han radicado las sustituciones de aminoácidos que distinguen a las hexoquinasa entre sí.

Es posible que los métodos utilizados para observar reacción inmunológica cruzada entre las cuatro hexoquinasas no hayan sido lo suficientemente sensibles para detectar algún determinante antigénico putativo común a las hexoquinasas. El uso futuro de procedimientos tan sensibles como radioinmunoensayo o ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay), o la microfijación de complemento, podrían resolver este problema.

#### Estudios comparativos

El suero inmune anti-hexoquinasa A de rata fue utilizado para estudiar el grado de reacción cruzada entre hexoquinasas A aislada de varios animales. Este tipo de estudios comparativos tiene interés por cuanto permitiría expandir la información obtenida por separación cromatográfica de las isoenzimas fosforilantes de glucosa en casi cien especies de vertebrados (Ureta, 1975; 1982; Ureta et al., 1971a, 1971b, 1973, 1975, 1978, 1981).

El antisuero demostró ser muy específico para la enzima de rata. Si bien fue capaz de disminuir la actividad de la enzima de ratón (Mus musculus) que pertenece, como la rata, a la familia Muridae del Orden Rodentia, se requerían concentraciones de suero cinco veces mayores que las efectivas con la enzima homóloga. Las enzimas de roedores pertenecientes a la familia Cricetidae (hamster, Akodon, Phyllotis) o a la familia Caviidae (cuy) u Octodontidae (degus) fueron marginalmente afectadas. Re-

sultados similares se observaron con la enzima de conejo (Orden Lagomorpha). En cambio, las enzimas de artiodáctilos (oveja y vaca) prácticamente no fueron afectadas.

Resultados más discriminatorios (pero cualitativos) se obtuvieron por medio del análisis por doble inmunodifusión. Si bien en todos los casos estudiados (Figs. 12 a 17) se obtuvieron líneas de precipitación, éstas mostraron sólo reacción de identidad parcial, con espolones claros, aún en el caso del ratón. Los espolones eran de longitud similar en el caso de las enzimas de roedores, mayor con la enzima de conejo, y aún mayor con la enzima de artiodáctilos.

Mientras se realizaban esos experimentos se tuvo la oportunidad de utilizar la técnica muy sensible de microfijación del complemento (Champion et al., 1975). Los resultados (Fig. 18) mostraron que con esta técnica el anticuerpo reconoce a las enzimas de varios roedores y que reacciona apenas con las enzimas de conejo y de artiodáctilos.

No se examinó el grado de reacción inmunológica cruzada con hexoquinasas A de aves o reptiles. Para esas hexoquinasas no se han descrito procedimientos de purificación ni tampoco es clara su asignación a las categorías de hexoquinasas A-D de mamíferos o anfibios. En efecto, las constantes de Michaelis, las especificidades de sustrato y movilidades cromatográficas de las enzimas de



aves y reptiles superiores son diferentes a las de mamíferos y no permiten su clara identificación (Ureta, 1982; Ureta et al., 1973, 1975, 1979). Por otra parte, la escasa reacción del antisuero con las enzimas de mamíferos no-roedores permite suponer que su reacción con enzimas de no-mamíferos debería ser aún menor, o nula. Desde luego, hexoquinasa A de hígado del sapo Bufo spinulosus no mostró reacción alguna con el suero inmune.

Todas estas consideraciones sugieren que la hexoquinasa A de vertebrados ha sufrido cambios evolutivos en su estructura primaria que han modificado marcadamente sus determinantes antigénicos.

La poca reacción cruzada entre hexoquinasas A de organismos muy relacionados se observa también en otros sistemas. La actividad fosfohexosa-isomerasa de hígado de rata no era inmunoprecipitada por un suero inmune anti-fosfohexosa-isomerasa de hígado de perro, en condiciones en que el antígeno homólogo lo era (Nisselbaum et al., 1961). Asimismo, Li et al. (1983) han comunicado que hay escasa reacción cruzada entre lactato-deshidrogenasas  $C_4$  de rata y de ratón aún cuando hay solo 32 diferencias en la secuencia de aminoácidos de un total de 330 residuos. Por el contrario, otras enzimas muestran gran conservación en su reactividad inmunológica. Quizás el caso más espectacular es el de la reacción entre una piruvato-quinasa de Escherichia coli y sueros anti-piruvato-quinasa de humano (Lincoln et al., 1977).

Aunque no hay mucha información disponible, es necesario destacar que un suero inmune anti-hexoquinasa D de rata (Pilkis et al. 1968; Clark-Turri et al., 1975) fue capaz de inhibir la actividad de la hexoquinasa D de mono (Saimiri scuirea) en la misma magnitud que la enzima de rata (Ureta et al., 1979) y a la de tortuga, aunque con menor intensidad (H. Niemeyer, comunicación personal). La hexoquinasa D de anfibios, en cambio, no fue afectada (Pilkis et al., 1968). En el caso de hexoquinasa D existiría, por lo tanto, conservación de algunos determinantes antigénicos. Puede suponerse entonces que las hexoquinasas acumulan sustituciones de aminoácidos con diferente velocidad.

## CONCLUSIONES

El suero inmune preparado en conejos por inyección repetida de hexoquinasa A pura de rata, ha permitido un mayor conocimiento acerca de uno de los componentes del sistema isoenzimático responsable de la fosforilación de glucosa en mamíferos.

Hexoquinasa A no comparte determinantes antigénicos con las hexoquinasas B, C o D. No obstante, la similitud de las características catalíticas, pesos moleculares (100.000 en el caso de las isoenzimas A, B y C; 50.000 en el caso de hexoquinasa D) y composiciones de aminoácidos, parece indicar que se trata de una familia de isoenzimas muy relacionadas entre sí. Por lo tanto, es razonable suponer que hexoquinasa A ha acumulado sustituciones de aminoácidos localizados en la superficie de la molécula con modificación de determinantes antigénicos supuestamente comunes a las cuatro isoenzimas. El hecho que las hexoquinasas B y D presenten reacción cruzada (Lawrence et al., 1982) podría indicar que estas hexoquinasas están más relacionadas entre sí. En otras palabras, el evento mutacional que las produjo es más reciente que el que dio origen a hexoquinasa A.

El suero inmune anti-hexoquinasa A de rata solo reconoce parcialmente a las enzimas provenientes de especies muy relacionadas con la rata. Aunque esto podría ser resultado de una



peculiaridad del suero, es tentador especular que las hexoquinasas acumulan sustituciones de aminoácidos con diferente velocidad, puesto que un suero anti-hexoquinasa D de rata, es capaz de reconocer enzimas homólogas de especies muy alejadas de la rata (Ureta et al., 1979). La disponibilidad, muy reciente, de sueros anti-hexoquinasa B y C de rata permitirá poner a prueba esa especulación.

## ANEXO 1

## Preparación de matrices inmunoabsorbentes

Las matrices inmunoabsorbentes se prepararon con sueros, inmune y control, de conejo, ligando las proteínas a Sepharose 4B según el procedimiento de March et al. (1974), como se describe a continuación:

a) Activación de Sepharose 4B

Una porción de 13 g de Sepharose 4B, lavada varias veces con agua bidestilada, en un embudo Buchner siliconizado, se suspendió en un volumen de agua bidestilada. A esta suspensión se agregaron 26 ml de carbonato de sodio 2 M mezclando con agitación suave durante 2 min. Se aumentó la velocidad de agitación y se agregaron 2,6 ml de bromuro de cianógeno en acetonitrilo (2 g de bromuro de cianógeno por ml de acetonitrilo). Después de agitar vigorosamente por 1 a 2 min, la Sepharose activada se lavó en un embudo Buchner con 5 a 10 volúmenes de bicarbonato de sodio 0,1 M pH 9,5, luego con agua bidestilada y finalmente con amortiguador borato pH 8,6.

b) Fijación del ligando

A 2 g de Sepharose activada se agregaron 2 ml de amortiguador borato pH 8,6 y 0,1 ml de suero inmune o suero control. La fijación se realizó a 4° durante 20 h con agitación continua. Posteriormente se lavó con 20 volúmenes de amortiguador borato pH 8,6, NaCl 0,5 M.

Para asegurar que todos los grupos reaccionantes del gel hubieran reaccionado, se agregó glicina 1 M en amortiguador borato y la fijación se continuó durante 4 h adicionales, a temperatura ambiente, con agitación ocasional.

Finalmente la Sepharose se lavó 10 veces con el amortiguador NaCl 0,5 M, para extraer las proteínas no ligadas.

c) Regeneración del inmuoadsorbente

La regeneración de los inmuoadsorbentes se conseguía lavando con tiocianato de potasio 4 M en amortiguador borato pH 8,6. A continuación se lavaba con el mismo amortiguador hasta desaparición del tiocianato lo que se verificaba por desaparición del precipitado rojo de tiocianato férrico, al agregar  $\text{FeCl}_3$  al 10 %.



## ANEXO 2

## Electroforesis en geles de poliacrilamida

Preparación de geles según Davis (1964)

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaba según el método de Davis (1964). Los geles de acrilamida al 7%, se preparaban en tubos de vidrio de 100 x 6 mm previamente lavados con mezcla sulfocrómica y sumergidos durante 30 min en solución de Agepon al 5 % v/v.

El gel separador se preparaba mezclando con agua las soluciones A, B y C en una proporción de 2:1:4:1. Solución A: acrilamida 28 % y bis-acrilamida 0,735 %; solución B: Tris 36,6 %, HCl 1,75 % y N,N,N,N'-tetrametilendiamina (TEMED) 0,23 %; solución C: persulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 0,14 %. El gel concentrador se preparaba a partir de las soluciones D, E, F y G, las que se mezclaban en la proporción de 2:1:1:4. Solución D: acrilamida 10 % y bis-acrilamida 2,5 %; solución E: TEMED 0,46 % v/v, Tris 5,98 % p/v y HCl 1 N hasta ajustar el pH a 6,7; Solución F: riboflavina 0,004 %; solución G: sacarosa 40 %. La polimerización de los geles se lograba por exposición a luz blanca, por al menos 60 min a temperatura ambiente.

Electroforesis

La electroforesis se llevaba a cabo en un aparato Bio-Rad modelo 150. Las cámaras se llenaban con amortiguador Tris-glicina 0,1 M pH 8,3. La muestra (0,2 ml que contenían entre 50 y 70  $\mu\text{g}$  de proteína), dializada contra el amortiguador Tris-glicina, se mezclaba con 5  $\mu\text{l}$  de azul de bromofenol 0,01 % y 50  $\mu\text{l}$  de sacarosa 40 % y se depositaba sobre el gel separador. Se aplicaba una intensidad de corriente constante de 1,5 mA por gel durante un tiempo aproximado de 60 min. Durante este tiempo el colorante

penetraba a través del gel espaciador. Entonces se aplicaban 3 mA por gel hasta que el marcador de azul de bromofenol migrara hasta alrededor del 90 % del largo del gel, lo que ocurría habitualmente al cabo de unas 3 h.

#### Tinción de proteínas

Los geles se retiraban de los tubos y se sumergían en una mezcla de Amido-Schwarz 0,2 % p/v y ácido acético 0,7 % v/v, durante 60 min. Para eliminar el exceso de colorante los geles se colocaban en una solución de ácido acético al 7 % en un aparato de destinción por difusión.

En ocasiones se empleó una solución de Azul Brillante de Coomassie R 0,025 % en solución acuosa de isopropanol 25 % y ácido acético 10 % para teñir las proteínas. El exceso de colorante se eliminaba empleando el mismo solvente.

#### Preparación de geles según Grossman y Potter (1974)

Para detectar la actividad de hexoquinasa A se utilizaba la técnica electroforética de Grossman y Potter (1974), también con geles de poliacrilamida al 7 %. El gel concentrador se preparaba mezclando las soluciones A, B, C y D en la proporción 1:2:1:4. Solución A: Tris 5,98 %, TEMED 0,46 % v/v y HCl hasta ajustar a pH 7,5; solución B: acrilamida 10 % y bis-acrilamida 2,5 %; solución C: riboflavina 0,004 %; solución D: glucosa 3 M. El gel separador se preparaba mezclando las soluciones C, E, F y G en la proporción 1:1:2:4. Solución E: Tris 6,85 %, TEMED 0,46 % v/v y HCl hasta ajustar a pH 7,5; solución F: acrilamida 40 % y bis-acrilamida 0,5 %; solución G: glucosa 0,2 M. Tanto el gel concentrador como el gel separador se dejaban polimerizar durante 30 a 60 min en presencia de luz blanca, a temperatura ambiente.

Sobre cada gel se depositaba la mezcla constituida por la muestra de enzima que tenía una concentración entre 50 y 70  $\mu\text{g}$  de proteínas y una actividad de 0,15 a 0,2 U de enzima, más 5  $\mu\text{l}$  de azul de bromofenol 0,01 %. El amortiguador que se empleaba

en este caso era una mezcla de ácido barbitúrico 30 mM, EDTA 4 mM (sal potásica), sulfato de magnesio 5 mM, glucosa 50 mM, DTT 5 mM y suficiente Tris hasta obtener pH 7,8 en un volumen total de 1 L. Se utilizaba una corriente constante de 3 mA por tubo durante alrededor de 3 h a 4°. Transcurrido este tiempo los geles se retiraban de los tubos, se medía la distancia recorrida por el marcador y se sumergían durante 30 min a 30° en un sistema de igual composición al empleado en el ensayo espectrofotométrico de actividad enzimática (véase **Materiales y Métodos**), pero que además contenía fenazina metosulfato y azul de nitrotetrazolio, ambos 0,4 mg/ml. Un gel control se incubaba en un sistema similar pero que no contenía ATP.



## ANEXO 3

## Microfijación del complemento

La preparación de los reactivos y su estandarización se hizo siguiendo la técnica de Bozicevich et al. (1946) con algunas modificaciones en relación con la estandarización de la suspensión de glóbulos rojos de cordero. Para reacciones de fijación del complemento se siguió la técnica descrita por Wasserman y Levine (1966).

Reactivos

Amortiguador trietanolamina. Solución stock: trietanolamina anhidra 28 ml; HCl 1 N 180 ml; NaCl 75 g;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1 g;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0,2 g; agua c.s.p. 1 L. Solución amortiguadora 0,1 M: 200 ml solución stock, 1 g de gelatina disuelta en alrededor de 20 ml de agua caliente, completar a 2 L.

Glóbulos rojos de cordero

a) Extracción de la muestra. La sangre se extrajo con jeringa estéril y se diluyó con un volumen de solución esterilizada Alsever modificada. La sangre se ocupaba entre el tercer y décimo día después de extraída. La solución de Alsever original (Alsever y Ainslie, 1941) consta de dextrosa 2,05 g, citrato de sodio 0,8 g, NaCl 0,42 g y agua c.s.p. 100 ml. La solución modificada (Kendrick et al., 1945) contiene los mismos componentes más la adición de ácido cítrico 0,055 g por 100 ml. La solución final esterilizada tiene pH 6,1.

b) Lavado de los eritrocitos. A un volumen de células se agregaban dos o tres volúmenes de suero fisiológico y se centrifugaban durante 5 min a 2.000 r.p.m. Se descartaba el líquido sobrenadante y la fase correspondiente a los glóbulos blancos. El

sedimento se resuspendía en suero fisiológico y se centrifugaba a 2.000 r.p.m. durante 5 min. Se repetía este procedimiento tres veces. Si después del tercer lavado el líquido sobrenadante seguía coloreado se eliminaban los glóbulos rojos por ser demasiado frágiles. Las células se resuspendían en suero fisiológico, se centrifugaban a 2.000 r.p.m. durante 10 min, se descartaba el líquido sobrenadante y con las células lavadas se preparaba una suspensión al 2 %. Se ajustaba la suspensión de manera de obtener una concentración de hemoglobina equivalente a una lectura de 150 (Klett-Summerson, filtro 56) en un sistema hemolizado diluido 1 : 10.

#### Titulación de la hemolisina

Se mezclaban amortiguador trietanolamina 47 ml, fenol al 5 % en NaCl 0,85 % 2 ml y hemolisina glicerizada 1 ml. La solución de fenol debe mezclarse bien con el amortiguador antes de agregar la hemolisina. La solución de hemolisina se mantenía a 4° y se descartaba si se observaba precipitado.

La dilución de hemolisina necesaria para sensibilizar la suspensión de glóbulos rojos al 2 % se determinaba preparando diluciones de hemolisina desde 1/2000 hasta 1/7000. Si la hemolisina no alcanzaba el título a 1/2000 se eliminaba y se ocupaba otra más activa. Para la sensibilización se mezclaban partes iguales de las diferentes diluciones de hemolisina con la suspensión de glóbulos rojos y se incubaban las mezclas durante 15 min a 25°. Para la titulación se preparaba una serie de 6 tubos que contenían 0,4 ml de trietanolamina y 0,4 ml de complemento diluido 1/400. En seguida se agregaban 0,2 ml de células sensibilizadas con las diferentes diluciones de hemolisina a cada uno de los tubos, se mezclaban e incubaban a 37° durante 1 h, se centrifugaban y se determinaba la absorbancia a 413 nm del líquido sobrenadante. La dilución óptima de hemolisina es aquella a la que aún cuando se aumentaba la concentración de hemolisina no



variaba sensiblemente la cantidad de complemento requerido para obtener el 50 % de hemólisis. Esta concentración se usaba para la sensibilización de los glóbulos rojos que servían para la titulación y reacciones de fijación del complemento.

#### Complemento

Se obtuvo de cuyes ayunados durante 12 h, pero con agua ad libitum. El conjunto de animales, no inferior a 6 hembras sanas cuyo peso fluctuaba entre 500 y 800 g, se sangraron sin anestesia por punción cardíaca en condiciones estériles. Después de la coagulación completa se centrifugaba a 1.000 rpm durante 15 min a 4° y se extraía el suero. Si presentaba hemólisis se descartaba. El suero se guardaba sellado en fracciones de 0,6 ml y se mantenía a -17°. También se lo podía mantener en una solución que resulta de una mezcla de componentes: Solución A: ácido bórico 1,55 g; NaCl saturado c.s.p. 100 ml. Solución B: sorbitol 9,55 g; azida de sodio 0,81 g; NaCl saturado c.s.p. 100 ml. Solución C: azida de sodio 0,81 g; NaCl saturado c.s.p. 100 ml. Para seguir este procedimiento se agregaban a 8 ml de suero, 1 ml de solución A, 0,1 ml de solución B y 0,5 ml de solución C y la mezcla se conservaba a 4°.

Titulación del complemento. Se diluía el complemento al 1/100. La titulación se realizaba como la titulación de hemolisina, con la única diferencia que los glóbulos rojos se sensibilizaban con la dilución óptima de hemolisina que se había obtenido según la titulación antes descrita. Los tubos se incubaban a 37° por 30 min, se centrifugaban y se determinaba la absorbancia a 413 nm en el líquido sobrenadante. La cantidad de complemento que presentaba un 50 % de hemólisis equivale a una unidad de complemento. Es recomendable titular siempre dos complementos diferentes por si uno tuviera poca actividad lítica. Las titulaciones del complemento había que practicarlas diariamente, poco antes de realizar la reacción de fijación del complemento.



### Microfijación del complemento

El antisuero de conejo se calentaba a 56° durante 30 min previamente a su uso para destruir su complemento. Las reacciones de fijación del complemento se realizaban de la siguiente manera: a una serie de 12 tubos plásticos con tapa, de 4 x 1 cm mantenidos en hielo, se agregaban 300  $\mu$ l de amortiguador trietanolamina, 100  $\mu$ l de antisuero, 100  $\mu$ l de complemento de cuy y 100  $\mu$ l de antígeno a concentraciones variables. Después de incubarse a 4° por 18 h se agregaban 100  $\mu$ l del sistema hemolítico constituido por partes iguales de glóbulos rojos de cordero y hemolisina antiglóbulos rojos de cordero. Se incubaban a 37° durante 60 min para que ocurriera la hemólisis, se sumergían en un baño con hielo para evitar una posterior hemólisis y los tubos se centrifugaban durante 10 min a 1.500 rpm para que sedimentaran los eritrocitos no lisados. Se determinaba la absorbancia (413 nm) del líquido sobrenadante. En cada experimento se incluían controles del antígeno, antisuero, complemento y del sistema hemolítico. Para asegurar la especificidad del sistema inmune se trabajó con un antígeno no relacionado inmunológicamente con los antígenos utilizados en las reacciones en estudio (seroalbúmina de bovino).

## REFERENCIAS

- Alsever J B y Ainslie R B (1941) A new method for the preparation of dilute blood plasma and the operation of a complete transfusion service. New York State J Med **41**, 126-131
- Bailey G S y Wilson A C (1968) Homologies between isoenzymes of fishes and those of higher vertebrates. Evidence for multiple  $H_4$  lactate dehydrogenases in trout. J Biol Chem **243**, 5843-5853
- Bozicevich J, Hoyem H M y Walston V M (1946) A method of conducting the 50 percent hemolysis end point complement-fixation test for parasitic diseases. Public Health Rep **61**, 529-534
- Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal Biochem **72**, 248-254
- Champion A B, Prager A M, Watcher D y Wilson A C (1974) Microcomplement fixation. En Biochemical and Immunological Taxonomy of Animals (Wright C A, ed) pp. 397-416. Academic Press, London.
- Chatterton T A, Reynolds C H, Lazarus N R y Pogson C I (1982) Immunological and kinetic properties of pyruvate kinase in rat pancreatic islets. Biochem J **204**, 605-608
- Chou A C y Wilson J E (1972) Purification and properties of rat brain hexokinase. Arch Biochem Biophys **151**, 48-55
- Clark-Turri L, Peñaranda J, Rabajille E y Niemeyer H (1974) Immunochemical titration of liver glucokinase from normal, fasted and diabetic rats. FEBS Lett **41**, 342-344
- Cornish-Bowden A (1977) Assessment of protein sequence identity from amino acid composition data. J Theor Biol **65**, 735-742



- Craven P A y Basford R E (1969) Brain hexokinase: immunohistochemical localization at the light microscopic level. Biochemistry 8, 3520-3525
- Creighton S R, McClure A M, Watrous B J y Hansen R J (1972) Hexose-ATP phosphotransferases: comparative aspects. III. Interrelationships of animal hexokinases. Comp Biochem Physiol 42B, 509-516
- Davis B J (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann N Y Acad Sci 121, 404-427
- Dawson D M, Eppenberger H M y Eppenberger M E (1968) Multiple molecular forms of creatine kinases. Ann N Y Acad Sci 151, 616-626
- Dunaway G A (1983) A review of animal phosphofructokinase isozymes with an emphasis on their physiological role. Mol Cell Biochem 52, 75-91
- Easterby J S (1971) The polypeptide chain molecular weight of a mammalian hexokinase. FEBS Lett 18, 23-26
- Easterby J S y O'Brien M J (1973) Purification and properties of pig heart hexokinase. Eur J Biochem 38, 201-211
- González C, Ureta T, Sánchez R y Niemeyer H (1964) Multiple molecular forms of ATP:hexose 6-phosphotransferase from rat liver. Biochem Biophys Res Commun 16, 347-352
- González C, Ureta T, Babul J, Rabajille E y Niemeyer H (1967) Characterization of isoenzymes of adenosine triphosphate : D-hexose 6-phosphotransferase from rat liver. Biochemistry 6, 460-468
- Grossbard L y Schimke R T (1966) Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms. J Biol Chem 241, 3546-3560



- Grossman S H y Potter V R (1974) Identification of rat hepatic glucokinase after polyacrylamide disc electrophoresis. Anal Biochem 59, 54-62
- Grossman S H, Dorn C G y Potter V R (1974) The preparation and characterization of pure rat liver glucokinase. J Biol Chem 249, 3055-3060
- Hedrick J L y Smith A J (1968) Size and charge isomer-separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch Biochem Biophys 126, 155-164
- Holmes R S y Scopes R K (1974) Immunochemical homologies among vertebrate lactate-dehydrogenase isozymes. Eur J Biochem 43, 167-177
- Holroyde M J, Allen M B, Storer A C, Warsy A S, Chesher J M E, Trayer I P, Cornish-Bowden A y Walker D G (1976) The purification in high yield and characterization of rat hepatic glucokinase. Biochem J 153, 363-373
- Holroyde M J y Trayer I P (1976) Purification and properties of rat skeletal muscle hexokinase. FEBS Lett 62, 215-219
- Hudson L y Hay F C (1979) Inmunología Práctica. Editorial J.I.M.S. Barcelona
- Kaplan N O (1968) Nature of multiple molecular forms of enzymes. Ann N Y Acad Sci 151, 382-399
- Kendrick D B Jr, Elliott J, Reichel J Jr y Vaubel E K (1945) Supply of preserved blood to european theater of operations. Bull U.S. Army Med Dept N° 84, 66-73
- Lawrence G M, Walker D G y Trayer I P (1983) Antigenic cross-reactivities between mammalian hexokinases. Biochim Biophys Acta 743, 219-225

- Lebherz H G, Bradshaw R A y Rutter W J (1973) Structural comparisons between the Class I fructose diphosphate aldolases from Micrococcus aerogenes and rabbit. J Biol Chem **248**, 1660-1665
- Lincoln D R, Rittenberg M B y Black J A (1977) Immunological cross-reaction between eukaryote and prokaryote pyruvate kinase. FEBS Lett **80**, 145-147
- Maccioni R y Babul J (1980) Purification and characterization of dog liver glucokinase. Arch Biol Med Exp **13**, 271-286
- March S C, Parikh I y Cuatrecasas P (1974) A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal Biochem **60**, 149-152
- Markert C L (1968) The molecular basis for isozymes. Ann N Y Acad Sci **151**, 14-40
- Markert C L, Shaklee J B y Whitt G S (1975) Evolution of a gene. Science **189**, 102-114
- Neumann S y Pfliderer G (1974) Immunological specificity of the isoenzymes I and III of human hexokinase (ATP-D-hexose 6-phosphotransferase EC 2.7.1.1). Estimation of isozyme pattern by quantitative immunotechniques. Biochim Biophys Acta **334**, 343-353
- Neumann S, Falkenberg F y Pfliderer G (1974) Purification and immunological characterization of human hexokinase isoenzymes I and III (ATP-D-hexose 6-phosphotransferase EC 2.7.1.1). Biochim Biophys Acta **334**, 328-342
- Niemeyer H y Ureta T (1972) Enzyme adaptation in mammals. En Molecular Basis of Biological Activity (Gaede K, Horecker B L y Whelan W J, eds). PAABS Symposium Vol 1, pp. 221-273. Academic Press, New York.
- Nisselbaum J S y Bodansky O (1961) Reactions of human tissue lactic dehydrogenases with antisera to human heart and liver lactic dehydrogenases. J Biol Chem **236**, 401-404



- Nisselbaum J S, Schlamowitz M y Bodansky O (1961) Immunochemical studies of functionally similar enzymes. Ann N Y Acad Sci **94**, 970-987
- Ouchi M e Ishibashi S (1975) Discrimination of antigenic site and thiol-inhibitor-sensitive site of hexokinase isoenzymes. Biochem J **149**, 481-483
- Pesce A, McKay R H, Stolzenbach F, Cahn R D y Kaplan N O (1964) The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. I. Properties of the crystalline beef and chicken enzymes. J Biol Chem **239**, 1753-1761
- Pilkis S J (1972) Rat hepatic glucokinase: improved purification and some properties. Arch Biochem Biophys **149**, 349-360
- Pilkis S J, Hansen R J y Krahl M E (1968a) Apparent molecular weight of some ATP:D-hexose 6-phosphotransferases: specific effects of Sephadex G-100. Biochim Biophys Acta **154**, 250-252
- Pilkis S J, Hansen R J y Krahl M E (1968b) Hexose-ATP phosphotransferases: comparative aspects. Comp Biochem Physiol **25**, 903-912
- Pollard-Knight D y Cornish-Bowden A (1982) Mechanism of liver glucokinase. Mol Cell Biochem **44**, 71-80
- Prager E M y Wilson A C (1971) The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. J Biol Chem **246**, 7010-7017
- Prager E M, Welling G W y Wilson A C (1978) Comparison of various immunological methods for distinguishing among mammalian pancreatic ribonucleases of known amino acid sequence. J Mol Evol **10**, 293-307
- Purich D L, Fromm H J y Rudolph F B (1973) The hexokinases: kinetic, physical and regulatory properties. Adv Enzymol **35**, 249-326



- Rajewsky K, Avrameas S, Grabar P, Pflleiderer G y Wachsmuth E D (1964) Immunologische spezifität von lactatdehydrogenase isozymen dreier säugetier-organismen. Biochim Biophys Acta 92, 248-259
- Redkar V D y Kenkare U W (1972) Bovine brain mitochondrial hexokinase. Solubilization, purification and role of sulphhydryl residues. J Biol Chem 247, 7576-7584
- Rutter W J, Rajkumar T, Penhoet E, Kochman M y Valentine R (1968) Aldolase variants: structure and physiological significance. Ann N Y Acad Sci 151, 14-40
- Schwartz G P y Basford R E (1967) The isolation and purification of solubilized hexokinase from bovine brain. Biochemistry 6, 1070-1079
- Seal U S, Phillips N I y Erickson A W (1970) Carnivora systematics: immunological relationships of bear serum albumins. Comp Biochem Physiol 32, 33-48
- Slein M W, Cori G T y Cori C F (1950) A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. J Biol Chem 186, 763-780
- Tanaka T, Harano Y, Sue F y Morimura H (1967) Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissues. J Biochem 62, 71-91
- Toro C (1982) Purificación de glucoquinasa de hígado de rata e inducción de un antisuero específico. Tesis de Licenciatura en Ciencias con Mención en Biología. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago
- Ureta T (1975) Phylogeny, ontogeny, and properties of the hexokinases from vertebrates. En Isozymes-III. Developmental Biology (Markert C L, ed). pp. 575-601. Academic Press, New York.

- Ureta T (1978) The role of isozymes in metabolism: a model of metabolic pathways as the basis for the biological role of isozymes. Current Top Cell Reg **13**, 233-258
- Ureta T (1982) The comparative isozymology of vertebrate hexokinases. Comp Biochem Physiol **71B**, 549-555
- Ureta T, González C, Lillo S y Niemeyer H (1971a) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. I. The influence of fasting and the nature of the diet on liver glucokinase and hexokinase of rodents. Comp Biochem Physiol **40B**, 71-80
- Ureta T, González C y Niemeyer H (1971b) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. II. Chromatographic patterns of glucokinase and hexokinases in the liver of rodents. Comp Biochem Physiol **40B**, 81-91
- Ureta T, Reichberg S B, Radojković J y Slebe J C (1973) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. IV. Chromatographic profiles of hexokinases from the liver of several avian species. Comp Biochem Physiol **45B**, 445-461
- Ureta T, Slebe J C, Radojković J y Lozano C (1975) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. V. Glucose phosphotransferases in the liver of reptiles. Comp Biochem Physiol **50B**, 515-524
- Ureta T, Radojković J, Lagos R, Guixé V y Núñez L (1979) Phylogenetic and ontogenetic studies of glucose phosphorylating isozymes of vertebrates. Arch Biol Med Exp **12**, 587-604
- Ureta T, Radojković J, Zepeda S y Guixé V (1981) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. VII. Mammalian hexokinases. Comp Biochem Physiol **70B**, 225-236

- Walker D G (1966) The nature and function of hexokinases in animal tissues. Essays Biochem 2, 33-67
- Wasserman E y Levine L (1961) Quantitative microcomplement fixation and its use in the study of antigenic structure by specific antigen-antibody inhibition. J Immunol 87, 290-295
- Wilkin G P y Wilson J E (1977) Localization of hexokinase in neural tissue. Light microscopic studies with immunofluorescence and histochemical procedures. J Neurochem 29, 1039-1051