

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica.  
Agregación de Bioquímica. Facultad de Farmacia  
Santiago de Compostela (España)

## Acidos siálicos

### I. Técnica de determinación cuantitativa del ácido N-acetil-neuramínico en suero humano y valores normales.

por  
J. A. Cabezas y J. Vázquez-Porto

(Recibido para publicar el 5 de marzo de 1962)

En trabajos anteriores de uno de nosotros (4-8) señalábamos la importancia bioquímica de los glucidoproteidos\*. Dentro de los mismos, la fracción seromucoide (también llamada impropriamente «mucoproteína sérica») obtenida por precipitación mediante ácido fosfowolfrámico de los filtrados perclórico o sulfosalicílico del suero no es una fracción proteica bien definida ni homogénea (1, 18), sino que consta de unos cinco componentes si procede del filtrado perclórico (el orosomucoide, como principal) y de tres si del sulfosalicílico (16, 1), según ha podido precisarse gracias a la inmunoelectroforesis. Ligeras variaciones en la concentración de los reactivos causan notables diferencias en los resultados (17), por lo que se tiende en la actualidad a generalizar el empleo de las condiciones operatorias óptimas.

El etanol a 0° (técnicas de COHN) presenta indudables ventajas sobre los restantes agentes precipitantes por no ejercer prácticamente acción desnaturalizante sobre la mayor parte de los glucidoproteidos.

---

\* Creemos que la palabra española «glucidoproteidos» es la más apropiada para designar de manera general a este complejo de sustancias, cuya nomenclatura se presta a errores y no ha sido inicialmente bien fijada (11), reservando la denominación de «glucoproteidos» o sus similares, más o menos equivalentes, para uno de los grupos.

Teniendo en cuenta que la determinación del seromucoide es más bien complicada y engorrosa (3) y que existen en la actualidad métodos ampliamente difundidos referentes a las cuantitativas en suero de los proteidos (LOWRY, Biuret), de las hexosas (autrona, orcinol), de las hexosaminas (ELSON-MORGAN modificado), pero no de los ácidos siálicos — probablemente por ser estas substancias conocidas desde hace menos tiempo —, hemos tratado de poner a punto una técnica relativamente sencilla y suficientemente precisa destinada a la valoración de estos últimos compuestos; para ello nos hemos basado, principalmente, en los trabajos de SVENNERHOLM (13) y MIETTINEN y colaboradores (10). Después de confirmarla a lo largo de unas 900 determinaciones, la exponemos detalladamente a continuación, así como los valores obtenidos en individuos normales. En otra publicación daremos a conocer nuestros resultados conseguidos en sueros patológicos.

### Material y métodos

#### 1. PRINCIPIO

Precipitación de los glucidoproteidos séricos por el etanol de 95 % a 0°. Hidrólisis y valoración del ácido N-acetilneuramínico (NANA) por el reactivo resorcinol-cúprico-HCl. Extracción del compuesto coloreado por el acetato de butilo y medida de su intensidad de color.

#### 2. MATERIAL

Es aconsejable el empleo de espectrofotómetro. (Nosotros hemos usado el Zeiss Mod. M 4 Q con cubetas de 2 cm. y 10 ml.) Puede utilizarse, aunque con menos exactitud, naturalmente, un buen fotocolorímetro.

Los tubos de centrífuga, de vidrio Pyrex, son cilindrocónicos, de 125 × 22 mm. provistos de tapón esmerilado.

#### *Reactivos*

1. Solución salina (ClNa al 0,9 %).
2. Etanol de 95 %, exactamente.
3. Reactivo resorcinol:
  - a) Solución madre: Resorcinol (p. anal.), recristalizado, al 2 % en agua destilada. (Si es «Merck» no es necesario recristalizarlo.) (Consérvese a 4° en frasco topacio; dura un mes, aproximadamente.)
  - b) Solución de trabajo: 80 ml. de ácido clorhídrico concentrado (p. anal.) de densidad 1,19 y concentración en HCl no <36,4 %; (Fe<sup>+++</sup> no >0,0001 %); 0,25 ml de solución de

$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 m. ; 10 ml. de solución madre de resorcinol; y agua destilada hasta 100 ml. Es necesario preparar esta solución de trabajo por lo menos 4 horas antes de su uso, siendo estable durante una semana, si se la conserva a 4° en frasco topacio, igualmente.

4. Reactivo blanco: Se prepara como la solución de trabajo, pero sin resorcinol.

5. Acetato de butilo.

(«Merck», «Butylicum aceticum 85 percent normal»; si se trata de otras marcas, bidestilado en aparato enteramente de vidrio, de P. E. 120°-126°.)

6. Solución tipo de NANA (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Guárdese en recipiente de plástico, a 0°.

### Técnica

Se diluye el suero en solución salina (R. 1) al 1 : 4. Se dejan caer, gota a gota, 0,4 ml. exactamente medidos de esta dilución sobre 20 ml. de etanol (R. 2) frío contenidos en un tubo de centrífuga rodeado por agua con hielo. Hágase esta operación por cuadruplicado (o, al menos, por triplicado).

Se agita suavemente y al cabo de 5 minutos se centrifuga a 3.000 r.p.m., 5 minutos. Se decanta con cuidado y se lava el precipitado con 20 ml. de etanol (R. 2). Se centrifuga de nuevo igual y se decanta como antes dejando el tubo invertido sobre papel de filtro a la temperatura del laboratorio hasta que el precipitado esté seco. Se disuelve el precipitado en 4 ml. de agua destilada.

Se depositan en otro tubo de centrífuga 4 ml. de la solución tipo NANA (R. 6) (tubo testigo). Debe prepararse por duplicado.

A un tubo problema se añaden 4 ml. del reactivo resorcinol blanco (R. 4) y a los demás y al testigo se agregan 4 ml. del reactivo resorcinol (R. 3b).

Todos los tubos, después de agitados, se mantienen en agua saturada de  $\text{ClNa}$  a  $108^\circ \pm 0,5^\circ$  durante 11 minutos, agitando ligeramente un par de veces. Al terminar este tiempo se enfrían rápidamente en agua con hielo; se les añaden 10 ml. de acetato de butilo (R. 5) y se agitan por inversión unas 50 veces, dejándolos después en agua con hielo y en la oscuridad durante 15 minutos.

Se elimina la capa inferior, acuosa, empleando una pipeta-jeringa y se hace la lectura a 580  $\text{m}\mu$ .

Cálculos :

$$\text{Concentración problema (mg. de NANA/100 ml. de suero)} = \frac{\text{D. O.}_{580} \text{ del problema}}{\text{D. O.}_{580} \text{ del testigo}} \times 60 \times f$$

f= factor de corrección que es necesario aplicar, entre otras causas, debido a la interferencia ocasionada por las hexosas, principalmente, aun siendo ésta mínima gracias al empleo del líquido extractor apropiado; («mg. de glucosa corresponde a 15  $\mu\text{g}$ , aproximadamente, de ácido siálico cuando se usa acetato de butilo y a 21  $\mu\text{g}$  con alcohol amílico») (10).  
f=0,95 en nuestras condiciones operatorias.

### Resultados

Los valores, obtenidos mediante la técnica antes descrita en sueros normales, se indican en el cuadro I, juntamente con los conseguidos por otros autores por los métodos que se citan.

En la figura 1 aparecen las cifras correspondientes a cuatro universitarios, varones, de 26 a 29 años, estudiados por nosotros durante diferentes días siguiendo dicha metódica.

Concentración de NANA en suero de 4 varones de 26 a 29 años, según diferentes días

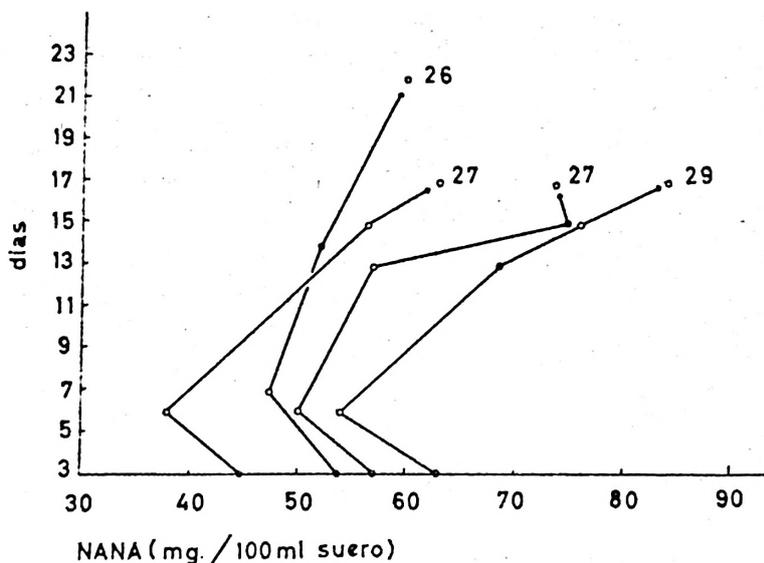


Figura 1

CUADRO I

Concentración de ácido N-acetilneuramínico (NANA) en sueros humanos normales, según diferentes autores y métodos.

Autor y referencia	NANA (mg./100 ml. suero) $m \pm s$	N.º casos	Edad	Met. determ. (precipitación coloración)	Año	País
WINZLER (19)	60 ± 3,1	20		Acido fosfowolf/ Difenil-amina	1955	EE. UU.
WINZLER (19)	66 ± 3,7	20		Acido fosfowolf/ Triptófano-perclórico	1955	EE. UU.
SVENNERHOLM (14)	50-70		6 meses 70 años	Etanol/ Resorcínol	1957	Suecia
SVENNERHOLM (15)	63	25		Resorcínol (columna)	1958	Suecia
BÖHM (2)	63,59 ± 9,69	80		Acido tricloro-acético/ Orcínol	1959	Alemania
ODIN y col. (12)	53 ± 5,8	60		Etanol/ Orcínol	1959	Suecia
BOTTIGER y CARLSON (3)	66,9 ± 6,7	127	26-72 años	Etanol/ Resorcínol	1960	Suecia
Presentes autores	60 ± 10,4	25	22-27 años	Etanol/ Resorcínol	1960	España
Presentes autores	64,4 ± 7,4	7	4 meses 2 años	Etanol/ Resorcínol	1960	España

### Discusión

Dos de los factores que más influyen en los resultados obtenidos por los diferentes autores son: a) El reactivo empleado para la precipitación (ácido fosfowolfrámico, ácido tricloroacético, etanol, etc.); b) la reacción coloreada usada para la cuantitativa.

Como es sabido (8, 9), ninguna de las reacciones (orcinol, difenilamina, p-dimetilaminabenzaldehído, triptófano-perclórico) que sirven para la determinación cuantitativa de ácidos siálicos son rigurosamente específicas. Parece ser que la del orcinol o la modificación del resorcinol, adoptada por SVENNERHOLM (sobre todo con aislamiento previo del ácido siálico mediante columnas cambiadoras de iones), son altamente sensibles y específicas.\*

Teniendo en cuenta la composición del suero humano y la existencia en él del ácido N-acetilneuramínico como representante único de los ácidos siálicos, puede conseguirse con la técnica del resorcinol llamada directa (o sea, sin paso por columnas) una precisión suficiente. En otros casos, será necesario acudir a una separación previa de dicho ácido mediante columnas de intercambio iónico.

La reacción con el ácido tiobarbitúrico, según WARREN, se considera como más sensible y específica aún que la del resorcinol, si bien parece ser algo más compleja y delicada.

Las cifras medias y las desviaciones tipo obtenidas por nosotros en adultos ( $60 \pm 10,4$  mg. NANA/100 ml. suero) y en niños ( $64,4 \pm 7,4$ ), normales, son concordantes sensiblemente con las de otros autores en otros países.

La influencia de la edad, aunque no muy intensa en los adultos, es digna de señalarse, como ya han destacado BÖTTIGER y CARLSON (3) en varones de 26 a 72 años. Sin embargo, BÖHM (2) no ha confirmado esta relación con la edad, en los adultos, ni la ha encontrado con respecto al sexo.

Hemos apreciado cifras relativamente bajas en recién nacidos, según detallaremos en otra publicación.

Los valores de un mismo individuo aparentemente normal pueden ser marcadamente distintos según diferentes días, y no coincidentes con los de otro del mismo sexo, edad y profesión.

### Resumen

Se detalla una técnica (fundada principalmente en los trabajos de SVENNERHOLM, MIETTINEN y col.) que permite valorar el ácido N-acetilneuramínico (NANA) en suero humano.

\* En nuestros ensayos la reacción del resorcinol ha resultado ser 1,5 veces, aproximadamente, más sensible que la del orcinol (reactivo de Bial).

Se indican las cifras de NANA así determinadas, correspondientes a sueros normales: a) de adultos, de edades comprendidas entre los 22 y los 27 años ( $m \pm s$ ,  $60 \pm 10,4$  mg de NANA/100 ml de suero); b) infantiles, de 4 meses a 2 años ( $64,4 \pm 7,4$ ) (Cuadro I). Se observa para un mismo individuo normal amplia variabilidad en días diferentes (Fig. 1).

### Summary

#### Sialic acids. I. Quantitative determination of N-Acetylneuraminic acid in human serum

A technique based on SVENNERHOLM'S cupric-resorcinol method for N-acetylneuraminic acid (NANA) determination in human serum is detailed.

Heating conditions have been  $108^{\circ} \text{C} \pm 0,5$  during 11 minutes. Instead of using amyl alcohol as extracting liquid, butyl acetate has been used, according to MIETTINEN and coll.'s advice, which permits the final separation of the resulting two layers without centrifuging.

NANA values in adults normal sera (22 to 27 yrs) have been:  $60 \pm 10,4$  mg. for 100 ml. serum; and for children (4 mths to 2 yrs):  $64,4 \pm 7,4$ .

These values agree fairly with results published by others (Table I).

In the same normal subject a large variability has been noticed according to different days (Fig. 1).

### Bibliografía

- (1) BISERTE, G., HAUEZ, R., and HAYEM-LEVY, A.: *Clin. Chim. Acta*, **5**, 272, 1960.
- (2) BÖHM, P.: *Dtsch. Zeitschr. f. Verdauungs - u. Stoffwechselkrankheiten*, **19**, 65, 1959.
- (3) BÖTTIGER, L. E. and CARLSON, L. A.: *Clin. Chim. Acta*, **5**, 670, 1960.
- (4) CABEZAS, J. A. et SANTOS-RUIZ, A.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, xxxix *Sup. III*, 187, 1957.
- (5) CABEZAS, J. A., LECLERC, M. and SANTOS-RUIZ, A.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, xxxix, *Sup. III*, 187, 1959.
- (6) CABEZAS, J. A.: *Comunicación 3-5 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas*. Barcelona, mayo, 1959.
- (7) CABEZAS, J. A., LUCAS-GÁLLEGO, J. y SANTOS-RUIZ, A.: *R. esp. Fisiol.*, **15**, 12, 1959.
- (8) CABEZAS, J. A.: *Acides sialiques: leur signification biochimique; conferencia; le Pharmacien Biologiste*, **II**, 9, 1961.
- (9) LONG, C. and STAPLES, D. A.: *Bioch. J.*, **73**, 385, 1959.
- (10) MIETTINEN, T. and TAKKI-LUKKAINEN, I. T.: *Acta Chem. Scand.*, **13**, 856, 1959.

- (11) MONTREUIL, J.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **3**, 3, 1957.
- (12) ODIN, L., WERNER, I. and BJÖRNESJÖ, K. B.: *Scand. J. Clin. & Lab. Inv.*, **11**, 246, 1959.
- (13) SVENNERHOLM, L.: *Bioch. Bioph. Acta*, **24**, 604, 1957.
- (14) SVENNERHOLM, L.: *Scand. Journ. Clin. & Lab. Inv.*, **10 Sup.**, **31**, 314, 1957.
- (15) SVENNERHOLM, L.: *Acta Chem. Scand.*, **12**, 553, 1958.
- (16) VAUX St. CIR, C., COURSON, J. et GRABAR, P.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 579, 1958.
- (17) WEIMER, H. E. y QUINN, F. A.: *Clin. Chim. Acta*, **3**, 419, 1958.
- (18) WINZLER, R. J.: *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. II. Intersc. Pub. Inc., New York, 1955.
- (19) WINZLER, R. J.: *Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*. J. & A. Churchill Ltd., London, 1958.