REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA
R. esp. Fisiol., 22, n.º 1, 15-18. 1966

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Farmacia
Universidad de Santiago de Compostela (España)
(Prof. : J. A. Cabezas)

Acidos siálicos. - V. Contenido en ácido N-glicolilneuramínico de los glucidoproteidos del calostro de vaca(*)

por
J. A. Cabezas, E. Trigueros (**) y J. Vázquez-Porto (**)

(Recibido para publicar el 31 de diciembre de 1965)

La existencia de derivados del ácido neuramínico en el calostro de vaca fue señalada en 1954 por KUHN, BROSSMER y SCHULZ (11) quienes aislaron de este material el metoxiderivado del ácido, por ellos denominado «lactamínico». Dicho ácido «lactamínico» es idéntico al N-acetilneuramínico (9) (NANA) (***). En trabajos de KLENK y UHLENBRUCK (9), KUHN y BROSSMER (12, 13), HEIMER y MEYER (8), CLARK y colb. (5) y KUHN y EKONG (14) se confirma que hay un radical acetilo, como mínimo, enlazado al ácido neuramínico en el calostro de vaca.

En cambio, la presencia de ácido N-glicolilneuramínico (NGNA) en calostro es indicada, solamente de pasada, por GIBBONS y CHEESEMAN (7), en 1962.

Habiéndose encontrado los ácidos acetil- y glicolilneuramínicos conjuntamente en todos los materiales hasta ahora estudiados procedentes de mamíferos y otros grupos (3), y teniendo en cuenta, en particular, la presencia de ambos ácidos en el calostro, leche y suero de cabra (2, 3), así como en el suero de ternera (6), se ha tratado de averiguar con certeza si existe el NGNA en los glucidoproteicos del calostro de vaca. Los resultados obtenidos confirman esta idea y han permitido conocer su proporción respecto al conjunto de ácidos acilneuramínicos (o ácidos siálicos) que integran el producto cristalizado conseguido.

Material y métodos

Partiendo de 1 litro de calostro, reunido en las 48 horas *postpartum*, el aislamiento de los ácidos acilneuramínicos se efectúa siguiendo el procedimiento des-

(*) Trabajo efectuado mediante una Ayuda a la Investigación concedida a este Laboratorio por el Ministerio de Educación Nacional.

(**) Becario de la Comisaría de Protección Escolar.

(***) Abreviaturas :
NANA = Acido N-acetilneuramínico.
NGNA = Acido N-glicolilneuramínico.

crito por FAILLARD y CABEZAS (6), fundado en el método de KLENK y UHLENBRUCK (10):

Una vez precipitadas las proteínas por etanol de 95 %, a 0°, se lava el precipitado con H_2SO_4 0,01 n, a 0-4°, hasta conseguir que el *p*H sea de 2,7. La hidrólisis, con H_2SO_4, se realiza durante 1 hora en seis veces sucesivas, hasta reacción negativa con resorcinol. El conjunto de hidrolizados es neutralizado en frío con solución saturada de $Ba(OH)_2$ y pasado por las columnas catiónica y aniónica, realizándose la elución de ésta con solución de ácido fórmico. Las fracciones de eluato ricas en ácidos acilneuramínicos son concentradas a baja temperatura y presión reducida, gradualmente (reponiendo el volumen inicial, en las primeras veces, con agua destilada) hasta eliminación del ácido fórmico, y finalmente se llevan a sequedad.

El producto obtenido se somete a cristalización (6). Los ensayos por cromatografía sobre papel se han hecho con una disolución al 2 % del producto cristalizado, usando los líquidos de desarrollo y los reveladores descritos en otra publicación (1), según las modalidades ascendente y descendente libre.

Las valoraciones de los ácidos acilneuramínicos se han efectuado mediante los

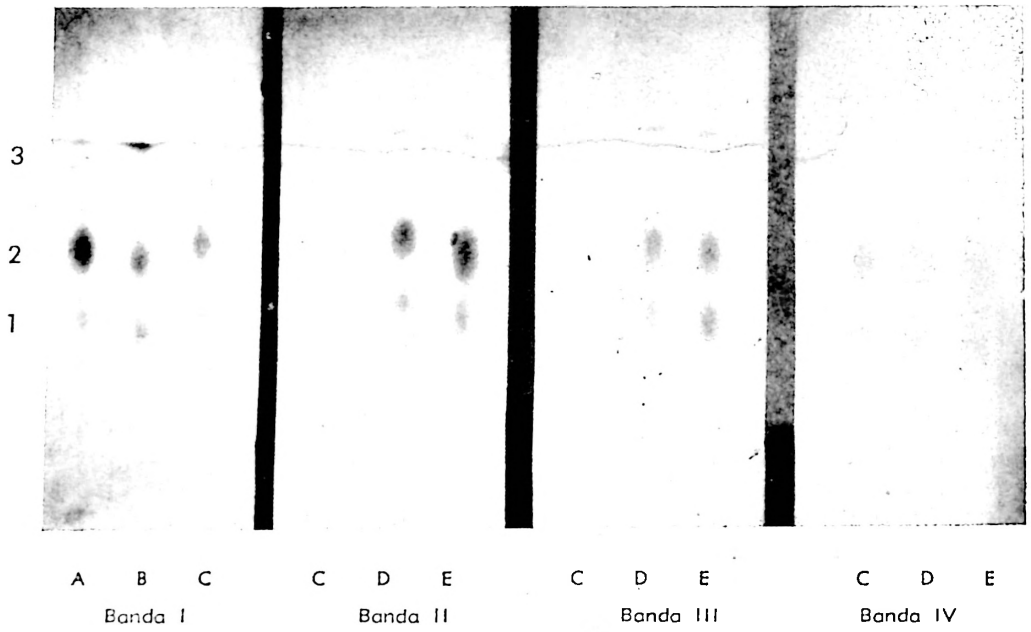

FIG. 1. Cromatograma ascendente sobre papel (Schleicher & Schüll 2040 b) de los ácidos acilneuramínicos existentes en el producto cristalizado procedente de los glucidoproteidos de calostro de vaca.

Desarrollado con n-butanol-n-propanol- HCl 0,1 n, durante 37 h, y cortado en cuatro bandas.
Bandas I y II: Tinción con reactivo de Ehrlich (1) (directo).
Banda III: Tinción con reactivo de Bial (6).
Banda IV: Tinción con reactivo de Aminoff (1).
A_1 = NGNA, patrón, procedente de suero de cabra (2).
A_2 = NANA, patrón, procedente de suero de cabra (2).
B_1 = NGNA, patrón, comercial.
B_2 = NANA, patrón, comercial.
B_3 = Acido diacetilneuramínico, patrón, comercial.
C, D y E = Problema, en cantidades crecientes.

métodos del resorcinol-cúprico-acetato de butilo y/o del tiobarbitúrico, previamente descritos (6, 1).

Resultados

La liberación de los ácidos acilneuramínicos a partir de los glucidoproteidos del calostro tiene lugar gradualmente, decreciendo a partir de la primera hidrólisis. Así, las determinaciones efectuadas en los hidrolizados primero y segundo arrojan las cifras de 372 y 260 mg de dichos ácidos (expresados en NANA), respectivamente; en el sexto hidrolizado el valor queda reducido a 15 mg, por lo cual fue desechado, teniendo en cuenta, además, la abundancia relativa de sustancias acompañantes.

En el conjunto de fracciones de eluato conteniendo ácidos acilneuramínicos, 1200 ml, se hallan en total 1,185 g de dichos ácidos; después de desecar se obtuvo un producto bruto de 1,400 g de peso, cuya riqueza es del 84 %. Una parte del mismo se cristalizó, consiguiéndose, al cabo de pocos días, la formación de cristales alargados, en forma de aguja, característicos de los neuraminderivados.

Mediante los cuatro líquidos de desarrollo y los reveladores usados en la cromatografía sobre papel (1) aparecieron, de manera constante en los numerosos cromatogramas realizados, dos manchas cuyos Rf son coincidentes con los patrones de NGNA y NANA utilizados simultáneamente. Se obtuvo, además, una tercera mancha, de intensidad bastante más débil, cuyo Rf es igual al del ácido N-acetil-O-acetilneuramínico patrón. Por último, en algunos casos aparece (según el líquido de desarrollo empleado), un cuarto componente, más rápido y escaso aún, que correspondería a otro ácido pluriacilneuramínico. En la fig. 1 se aprecian estos resultados en un cromatograma que, después de desarrollado, se cortó en varias bandas, las cuales fueron reveladas con tres reactivos diferentes (1, 6), dotados de gran sensibilidad y especificidad en las condiciones empleadas.

La proporción en que se halla el NGNA respecto a la totalidad de los ácidos acilneuramínicos en el producto cristalizado (determinada en los eluatos de las zonas correspondientes, no reveladas, de los cromatogramas) es del 13,3 por ciento, según puede apreciarse en la Tabla I.

TABLA I

Concentración, en %, de los ácidos acilneuramínicos existentes en el producto cristalizado procedente de calostro de vaca.

	NGNA	Otros ácidos acilneuramínicos en conjunto
(*) n	17	
m ± s	(**) 13,3 ± 2,0	(***) 86,7 ± 2,0

(*) n = número de determinaciones, efectuadas por duplicado. (La recuperación fue siempre superior al 85 por ciento).
m ± s = valor medio ± desviación tipo.
(**) Valor hallado por el método del tiobarbitúrico (1).
(***) Valor calculado por diferencia.

Discusión

De los resultados anteriores se deduce que son varios los ácidos acilneuramínicos existentes en la fracción glucidoproteídica del calostro de vaca. La cifra global de los mismos es relativamente elevada, como cabía esperar.

La proporción que hemos encontrado de NGNA, respecto a los restantes, es más bien escasa, al igual que ocurre en el calostro de cabra (10,4 %) (2).

El ácido predominante es el NANA, siguiéndole después el NGNA, y en pequeñísima proporción otros pluriacilneuraminderivados.

Los ácidos que hemos estudiado se

hallan en las fracciones glucidoproteídicas en forma combinada, liberándose mediante hidrólisis ácida suave con facilidad, en condiciones similares a como sucede en glucidoproteidos procedentes de otras materias primas que tienen enlazados en el extremo de sus moléculas dichos ácidos (1, 2). No se excluye la posibilidad de que, además, puedan encontrarse en forma libre, al igual que ocurre en otros materiales biológicos (3).

Se observa, por otra parte, un cierto paralelismo, cualitativo, entre los ácidos acilneuramínicos del suero (6) y del calostro bovinos, de modo análogo a como hemos apreciado en la especie caprina (2).

Finalmente, la presencia de NGNA en los glucidoproteidos del calostro de vaca viene a confirmar la idea de que los ácidos N-glicolil y acetilneuramínicos coexisten, en proporciones variables, particularmente en todos los materiales hasta ahora estudiados procedentes de mamíferos (3), faltando aún por conocer bastantes aspectos relacionados con su significación bioquímica (*).

Resumen

Se señala la presencia del ácido N-glicolilneuramínico (NGNA) en el producto cristalizado procedente de la fracción glucidoproteídica que resulta de precipitar con etanol el calostro de vaca.

Cuantitativamente, el ácido que predomina en este producto cristalizado es el N-acetilneuramínico (NANA), siguiéndole el NGNA, y en pequeñísima proporción se distingue, por cromatografía sobre papel, otro (a veces, otros dos) componentes que son, muy probablemente, ácidos pluriacilneuramínicos.

La proporción del NGNA es del 13,3 % respecto a la totalidad de los restantes.

Summary

Sialic acids. V. — Content in N-glycolylneuraminic acid of the glycoproteins from cow colostrum.

After precipitating cow colostrum with ethanol a glycoprotein has been obtained which gives a crystallized product containing N-glycolylneuraminic acid (NGNA).

N-acetylneuraminic acid (NANA) is the main substance in this crystallized product; it is followed by the NGNA; by paper-chromatography another (sometimes two) component appears as a very weak spot; it corresponds likely to pluriacylneuraminic acids.

The percent of NGNA is 13,3 % in relation with the whole of the remaining acids in the crystallized product.

Bibliografía

(1) CABEZAS, J. A., V-PORTO, J. FROIS, M.ª D., MARINO, C. y ARZÚA, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 318, 1964.

(2) CABEZAS, J. A., VÁZQUEZ-PORTO, J. y FROIS, M.ª D.: *VI Congreso Internacional de Bioquímica, Nueva York* 1964, «*Abstrats*», VI, p. 505.

(3) CABEZAS, J. A. (próximo a publicarse).

(4) CABEZAS, J. A., VÁZQUEZ-PORTO, J. y TRIGUEROS, E.: (en prensa).

(5) CLARK, W. R., JACKSON, R. H. y PALLANSCH, M. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 129, 1962.

(6) FAILLARD, H. y CABEZAS, J. A.: *Hoppe-Sey. Z. physiol. Chem.*, **333**, 266, 1963.

(7) GIBBONS, R. A. y CHEESEMAN, G. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 354, 1962.

(8) HEIMER, R. y MEYER, K.: *Biochim. Biophys, Acta*, **27**, 490, 1958.

(9) KLENK, E. y UHLENBRUCK, G.: *Hoppe-Sey. Z. Physiol. Chem.*, **305**, 224, 1956.

(10) KLENK, E. y UHLENBRUCK, G.: *Hoppe-Sey. Z. Physiol. Chem.*, **307**, 266, 1957.

(11) KUHN, R., BROSSMER, R. y SCHULZ, W.: *Chem. Ber.*, **87**, 123, 1954.

(12) KUHN, R. y BROSSMER, R.: *Chem. Ber.*, **89**, 2013, 1956.

(13) KUHN, R. y BROSSMER, R.: *Angew. Chem.*, **68**, 211, 1956.

(14) KUHN, R. y EKONG, D.: *Chem. Ber.*, **96**, 683, 1963.

(*) Después de escrito el presente artículo hemos visto que muy recientemente KUHN y GAUHE (*Chem. Ber.*, **98**, 395, 1965) mencionan la existencia del NGNA en el calostro de vaca, formando parte de un oligósido, N-glicolilneuraminil-lactosa.