

Laboratorio de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Universidad de Santiago de Compostela (España)

Ácidos siálicos. — VII. Composición y modificaciones del contenido de neuraminderivados del calostro humano *

por

J. A. Cabezas, A. Carrión y J. Vázquez-Porto

(Recibido para publicar el 13 de octubre de 1967)

Desde los primeros estudios comparados referentes a la composición química de la leche de diversos mamíferos, se ha observado una gran diferencia entre la composición de la leche humana y la de otras especies. Estas diferencias, de tipo cuali y cuantitativo, son particularmente acentuadas en lo relativo a la parte glucídica. Es sabido que como componentes glucídicos de la secreción láctea humana se hallan, además de la galactosa, la glucosa, la N-acetilglucosamina y la fucosa, los ácidos acilneuramínicos o siálicos. La existencia del ácido N-acetilneuramínico (NANA) ** en la leche de mujer fue demostrada por GYÖRGY y col. (8, 16) (que lo denominaron ácido «ginamínico»), y, casi simultáneamente, por KUHN y col. (11), quienes lo designaron como ácido «lactamínico». KLENK y UHLENBRUCK (9) comprobaron que el ácido lactamínico existente en el calostro de vaca es idéntico al N-acetilneuramínico descubierto por KLENK con anterioridad en otros materiales. Posteriormente se han dado a conocer diversos e interesantes trabajos

relativos a los constituyentes glucídicos (5-7, 10, 12-14) y a las caseínas de la leche humana. En la actualidad se admite que es considerable la heterogeneidad de todas estas fracciones, tanto protídicas como glucídicas, así como la pluralidad de los oligósidos en que interviene el ácido neuramínico, la composición de algunos de los cuales sólo en fechas más recientes ha sido precisada (12).

Experimentando la secreción calostrálica humana cambios notables en la concentración de sus componentes durante los primeros días *post-partum*, hemos creído conveniente analizar con algún detalle las

* Trabajo efectuado mediante una Ayuda a la Investigación concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

** Abreviaturas:

NANA = Ácido N-acetilneuramínico.

NGNA = Ácido N-glicolilneuramínico.

F.S.-80 = Fracción de leche calostrálica humana soluble en etanol de 80 %.

Pp-80 = Precipitado resultante del fraccionamiento anterior.

modificaciones referentes a los ácidos siálicos, en dos fracciones: la soluble en etanol (a 0° C) de concentración final de 80 % (que denominamos «F.S.-80») y el precipitado restante («Pp-80») (que comprenden, respectivamente, a los oligósidos y a los proteidos, en términos generales). Además, hemos confirmado la naturaleza del ácido existente en dichas fracciones, y se han obtenido datos acerca de su estado (libre en parte) y facilidad de su liberación de las moléculas en que se halla cambiado.

Material y métodos

Para los ensayos destinados fundamentalmente a la identificación de la naturaleza del ácido siálico y sus compuestos, se ha partido de 625 ml de muestra, procedente de cuatro mujeres que participaron en proporción sensiblemente igual, y habiéndose recogido al tercer día *post-partum*. Siempre se efectuó la precipitación con etanol del 95 % a 0° a razón de 4 vol. por 1 vol. de leche. Después de dejar una noche a 4°, se realizó la separación de ambas fracciones (F.S.-80 y Pp-80) mediante filtración. La F.S.-80 fue concentrada a presión reducida, sin sobrepasar los 27°, hasta un volumen sensiblemente igual al inicial; los lípidos de la misma fueron eliminados mediante centrifugación a baja temperatura, decantación y, finalmente, con varios lavados con éter; después de lo cual, el producto obtenido (unos 30 g) se disolvió en agua y se pasó directamente, sin hidrólisis, por columnas de cambio iónico (4) con el fin de fijar en la aniónica los componentes ácidos. A continuación de lavar con agua, se eluyó la columna aniónica con ácido fórmico, recogiendo las fracciones que dieron positiva la reacción del resorcinol-acetato de butilo; dichas fracciones fueron reunidas y llevadas a sequedad. [Detalles del procedimiento y métodos de valoración pueden verse en otras publi-

caciones (2, 3)]. El producto resultante (1,1 g) se sometió a los ensayos de cromatografía sobre papel, empleando cinco líquidos de desarrollo (1, 2), utilizando papel Schleicher & Schüll 2043b, según las modalidades ascendente y descendente (ésta a frente libre), durante periodos comprendidos entre 14 y 40 horas.

Los análisis de muestras individuales fueron realizados precipitando volúmenes de 1 a 8 ml (habitualmente 5 ml) de leche calostrada, procedente de 20 mujeres de edades comprendidas entre 20 y 40 años, con 4 vol. de etanol del 95 %. Después de dejar dos horas a 4°, se separaron las F.S.-80, individualmente, y se llevaron a sequedad; a continuación se disolvieron en agua y pasaron, sin hidrólisis previa, por columnas iónicas de tamaño adecuado, efectuando la elución, para proceder a la valoración del NANA en cada muestra.

Los Pp-80 fueron hidrolizados con H₂SO₄ 0,03n, a pH, durante una hora a 80°. (Una segunda hidrólisis, efectuada en ocasiones, sólo produjo un rendimiento escasísimo). Los hidrolizados se separaron del residuo y de los lípidos sobrenadantes por centrifugación y extracción; después de adicionar solución saturada de Ba(OH)₂ hasta pH 5,8 y recoger los sobrenadantes de la centrifugación, éstos se pasaron por las columnas iónicas, que después se eluyeron. Como quiera que alguno de los eluatos así obtenidos dieron a veces reacción del resorcinol demasiado débil, fue necesario reducir su volumen hasta 1/10 para efectuar la valoración.

Las cristalizaciones de los productos procedentes de ambas fracciones se realizaron según el procedimiento detallado en otra publicación (4).

Las osas fueron valoradas por el método del orcinol de TILLMANS y PHILIPPI, según describe MONTREUIL (15), y los glúcidos reductores por el procedimiento del ferricianuro detallado por el mismo autor (15).

Resultados

En el producto de la purificación (antes de cristalizado) de la F.S.-80 se lograron caracterizar NANA, neuraminlactosa y tres neuraminoligósidos, cuando se emplearon los líquidos de desarrollo números 1.º y 4.º (2) y n-butanol-piridina-HCl 0,1n (5:3:2, v/v) (1). Con los otros dos solventes la resolución de los oligósidos fue

menos completa. En la cromatografía de la figura 1 se reconocen dichos componentes.

No se detectaron NGNA ni pluriacetilneuramínicos.

Efectuadas hidrólisis del producto de la F.S.-80 con ácido sulfúrico y clorhídrico de normalidades comprendidas entre 0,01 y 0,1, y tiempo de 1 a 25 min., se dedujo que la liberación del NANA, a partir de los oligósidos, se lograba en buenas condiciones a los 5 min. empleando HCl 0,02n, según se refleja en la figura 2. Pudo así determinarse la cifra de ácido siálico libre (antes de hidrolizar) y la del total (después de hidrolizar) de la F.S.-80, valorándose también osas totales y glúcidos reductores, según se expresa en la tabla I.

Los típicos cristales del NANA procedente de la F.S.-80 aparecieron también al cristalizar el ácido siálico del Pp-80.

Las modificaciones en el contenido to-

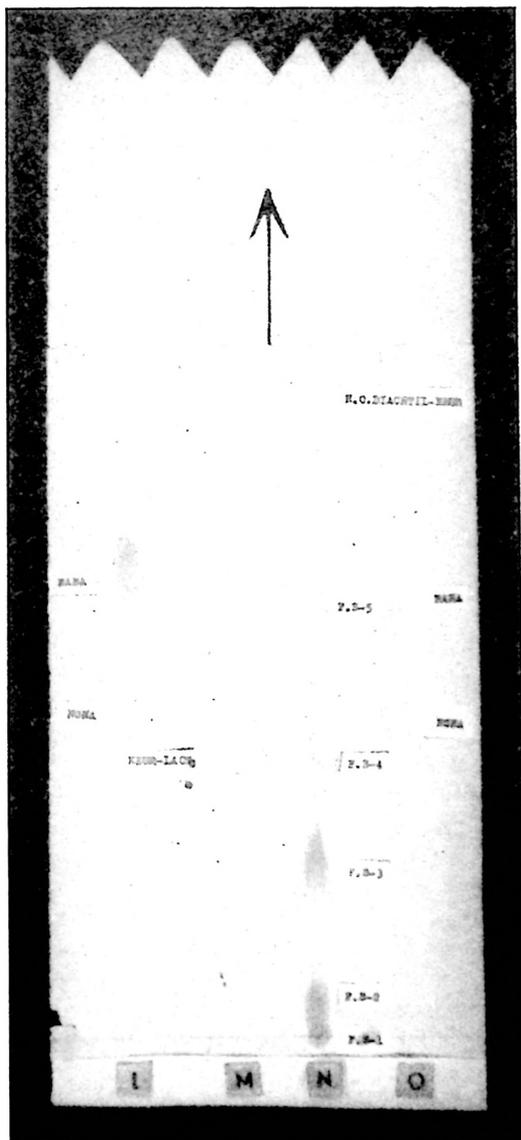


FIG. 1. Cromatograma sobre papel Schleicher & Schüll 2043 b, modalidad descendente a frente libre (50 horas) de los neuraminderivados estudiados en la fracción de leche calostro humana soluble en etanol de 80 %.

Líquido de desarrollo: n-butanol—piridina—HCl 0,1n (5:3:2, v/v) (1). Tinción con el reactivo de Ehrlich (modalidad directa) (2, 3).

L = Patrón: L_{NGNA} = Patrón de NGNA (cristalizado) procedente de leche de vaca.

L_{NANA} = Patrón de NANA (cristalizado) procedente de leche de vaca.

M = Patrón: M_{NEUR-LAC} = Patrón de neuraminlactosa (regalo del Dr. H. Noll).

N = Problema, mostrando los neuraminderivados que, convencionalmente, designamos como F.S.-1, F.S.-2, F.S.-3, F.S.-4 y F.S.-5. Obsérvese que el F.S.-5 corresponde a NANA, y el F.S.-4 a neuraminlactosa. Los otros tres, de R_f menor, son neuraminoligósidos.

O = Patrón: O_{NGNA} = Patrón de NGNA (cristalizado) procedente de calostro de vaca.

O_{NANA} = Patrón de NANA (cristalizado) procedente de calostro de vaca.

O_{N.O. DIACETIL-NEUR} = Patrón de ácido diacetilneuramínico, procedente igualmente, de calostro de vaca.

tal del ácido siálico, desde el primero hasta el noveno día después del parto, fueron estudiadas en dos series de ensayos, los cuales dieron resultados paralelos. Los valores de la segunda serie se expresan en la figura 3. Al determinar las concentraciones del NANA en las muestras individuales, tanto en la F.S.-80 como en el Pp-80, se obtuvieron valores como los que se indican también en la figura 3. Por último, se confirmaron estos resultados preparando disoluciones al 5 %, exactamente, de los productos correspondientes a la F.S.-80 y al Pp-80 de

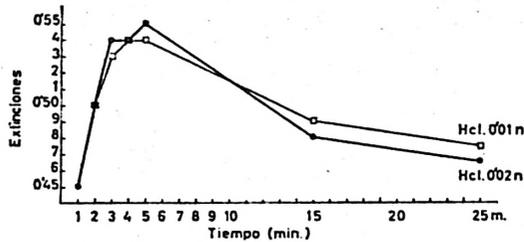


FIG. 2. Liberación del ácido siáico a partir del producto procedente de la fracción de leche calostroal humana soluble en etanol del 80 por ciento (F.S.-80). (Determinación por el método del ácido tiobarbitúrico.)

TABLA I

Concentración de NANA, osas totales y glúcidos reductores en el producto procedente de la fracción de leche calostroal (625 ml) soluble en etanol del 80 % (F.S.-80).

Producto g	Acido N-acetilneuramínico		Osas %	Glúcidos %
	total %	libre %		
1,1	39	32	56	43

muestras individuales de los cinco días siguientes al parto; depositando 20 μ l de cada una en papel de cromatografía, desarrollando y revelando, se observó que la intensidad de las manchas correspondientes a la F.S.-80 era constante, mientras que disminuían las del Pp-80.

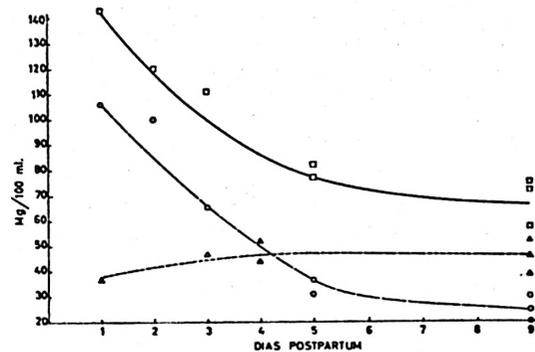


FIG. 3. Modificaciones en la concentración de ácido siáico según los días.

□ — Contenido total de ácido siálico.
 ○ — Contenido en ácido siáico del Pp-80.
 △ — Contenido en ácido siáico de la F.S.-80.

Discusión

Se ha encontrado NANA, pero no NGNA, tanto en la F.S.-80 como en el Pp-80, al igual que en los restantes materiales estudiados en la especie humana.

El efectuar los ensayos de identificación con los productos purificados de la F.S.-80 antes de su cristalización obedece al intento de evitar que dichos oligósidos fueran escindidos al emplear ácido acético a temperatura próxima a los 50° en el proceso de cristalización (4). Otros procedimientos de cristalización, aparentemente más suaves, hubieran podido también provocar alteraciones. Dado el grado de purificación conseguido mediante el empleo de columnas iónicas, los resultados son prácticamente concordantes con los que se hubieran logrado después de una cristalización, a juzgar por los datos deducidos de los cromatogramas.

El porcentaje de NANA libre en la F.S.-80 aparece como relativamente alto. Es de advertir que tal vez en la realidad dicho valor sea inferior, habiendo provocado las columnas iónicas un inevitable efecto hidrolítico, a pesar de las precau-

ciones tomadas. Sin embargo, la curva de elución de los neuraminoligosidos comparada con la de los ácidos acilneuramínicos señaló que esta hidrólisis no fue muy acentuada.

La hidrólisis efectuada con HCl, en las condiciones indicadas, señala la facilidad con que se libera el NANA de los neuraminoligosidos, verosímilmente por ocupar una posición extrema en dichas moléculas.

Dada la especificidad de los reveladores empleados para teñir los cromatogramas 2-4), es evidente que los oligósidos detectados constan de algún resto de ácido neuramínico. No se ha pretendido hacer un estudio detenido de dichos oligósidos; que, por otra parte, han sido detalladamente investigados por varios autores. Así, KUHN y col. (12) han identificado los compuestos de incluso tres pentasacáridos formados por NANA, glucosa, galactosa (2 moléculas) y acetilglucosamina.

Se deduce de los resultados obtenidos que las modificaciones en el contenido de NANA son notables en el Pp-80, decreciendo a medida que la secreción calostrual tiende a convertirse en leche normal. En cambio, las variaciones en las cifras de NANA de la F.S.-80 apenas se manifiestan en el período estudiado. Se confirma así la observación de otros autores (14) de que los valores de los glúcidos de las leches calostrales disminuyen progresivamente hasta un valor límite que se alcanza alrededor del 8° día *post-partum*.

Resumen

Después de confirmar que es el ácido N-acetilneuramínico (NANA) el ácido siálico existente en la secreción calostrual humana, se estudian las modificaciones (desde el primero al noveno día *post-partum*) en el contenido en NANA total de dicha secreción, del NANA de la fracción soluble en etanol del 80 % (F.S.-80) y del NANA del precipitado glucido-proteídico restante (Pp-80). Se deduce que, así como la cifra de NANA de los neuraminoligosidos de la fracción soluble experimenta escasas variaciones durante este período, los va-

lores de NANA total y NANA de los glucoproteidos disminuyen, de modo sensiblemente paralelo, desde el primer día. Se discuten también otros aspectos relacionados con la concentración de NANA libre y combinado en dicha fracción soluble, facilidad de su liberación, etc.

Summary

Sialic acids. — VII. Composition and modifications of the content of the neuraminderivatives from human colostrum

After confirmation that the N-acetylneuraminic acid (NANA) is the sialic acid existing in human colostrum, the variations in the values of the total NANA of this secretion, the NANA of the soluble fraction in ethanol of 80 % (F.S.-80) and the NANA of the glycoprotein precipitate (Pp-80) are studied, from the first to the ninth day after delivery. It can be deduced that the concentration of NANA from the neuraminoligosaccharides of the soluble fraction does not vary practically, but that of the glycoprotein NANA and total NANA does, and it decreases deeply and parallelly. Other aspects referring to the concentration of the free and bound NANA of the soluble fraction, facility of its split, etc., are discussed.

Bibliografía

1. BOURRILLON, R., y MICHON, J.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **41**, 267, 1959.
2. CABEZAS, J. A., et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **83**, 318, 1964.
3. CABEZAS, J. A.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **48**, 381, 1966.
4. FAILLARD, H., y CABEZAS, J. A.: *Hoppe-Sey. Z. Physiol. Chem.*, **333**, 266, 1963.
5. GOT, R., FONT, J., BOURRILLON, R., y CORNILLON, P.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **74**, 247, 1963.
6. GOT, R., FONT, J., y BOURRILLON, R.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **78**, 367, 1963.
7. GOT, R., FONT, J., y MARNAY, A.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**, 417, 1965.

8. HOOVER, J. R., BRAUN, G. A., y GYÖRGY, P.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **47**, 213, 1953.
9. KLENK, E., y UHLENBRUCK, G.: *Hoppe-Sey. Z. physiol. Chem.*, **305**, 224, 1956.
10. KUHN, R.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 297, 1958.
11. KUHN, R., y BROSSMER, R.: *Chem. Ber.*, **89**, 2013, 1956.
12. KUHN, R., y GAUHE, A.: *Chem. Ber.*, **95**, 513, 1962.
13. MONTREUIL, J.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 1399, 1960.
14. MONTREUIL, J., y MULLET, S.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 365, 1960.
15. MONTREUIL, J., y SCHEPPLER, N.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **41**, 13, 1959.
16. ZILLIKEN, F., BRAUN, G. A., y GYÖRGY, P.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **54**, 564, 1955.