

Acidos siálicos. XIII. Contenido en ácido N-acetilneuramínico, hexosaminas y ácido pirúvico, y actividad N-acetil- β -glucosaminidásica de sueros normales y cancerosos *

J. A. Cabezas y Eduvigis Porto

Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias.
Universidad de Salamanca (España)

(Recibido el 30 de junio de 1970)

J. A. CABEZAS and E. PORTO. *Sialic Acids. XIII. Content In N-acetylneuraminic Acid, Hexosamines, Pyruvic acid, and N-acetyl- β -glucosaminidase Activity In Normal and Cancer Sera.* R. esp. Fisiol., 26, 339-346, 1970.

Taking as references the mean values (in mg/100 ml of serum) of the sialic acids (as N-acetylneuraminic acid) (69.2 ± 4.6), hexosamines (as glucosamine) (59.4 ± 8.2), pyruvic acid (in plasma) (1.4 ± 0.4) and the N-acetyl- β -glucosaminidase activity ($20.0 \pm 3.6 \mu\text{m}$ of p-nitrophenol liberated by 100 ml of serum in 30 min. at pH= 4.8 and 37° C) determined in 21 normal adults, the values obtained in 76 samples of cancer sera, classified in 11 groups, and 9 samples of arthrosis, have been compared. It has been deduced that the mean values of sialic acids, hexosamines and N-acetyl- β -glucosaminidase for almost all pathological cases are higher than the normal, but not those of the pyruvic acid, which show a big variability; furthermore, some parallelism can be appreciated between the mean values of the respective groups for sialic acids, hexosamines and N-acetyl- β -glucosaminidase. After treatment with telegammatherapy, the values of sialic acids are higher than before; those of the hexosamines are a little lower and those of the pyruvic and N-acetyl- β -glucosaminidase are very irregular (higher or lower). Finally, some metabolic aspects of the plasma protein-bound carbohydrates are discussed.

Durante los últimos diez años, y merced a los trabajos principalmente de WARREN *et al.* (41, 42), ROSEMAN *et al.* (15), y FAILLARD *et al.* (37, 38), se ha avanzado de manera considerable en el conocimiento del metabolismo de los ácidos siálicos o acilneuramínicos. Aun sin estar completamente esclarecidos algunos aspectos de su biosíntesis, se sabe en la actualidad

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

que, a partir de la molécula de glucosa, puede llegarse, mediante sucesivas etapas (esquema I), a la molécula del ácido N-acetilneuramínico (NANA) ** (42).

** Abreviaturas:

NANA = Acido N-acetilneuramínico;
PEP = Fosfoenolpiruvato;
Pi = Fosfato inorgánico;
CTP = Citidintrifosfato;
CMP-NANA = Citidinmonofosfato-
Acido N-acetilneuramínico;
UDP = Uridindifosfato.

sanguíneas (24). Pero todavía son pocos los datos que se poseen acerca de la participación de la misma en procesos metabólicos.

En el presente trabajo se resumen los resultados obtenidos en el estudio comparativo de las concentraciones de NANA, hexosaminas, ácido pirúvico, y de la actividad N-acetil- β -glucosaminidásica en muestras normales y de pacientes diagnosticados de diversos tipos de cáncer y artrosis.*

Material y métodos

Las muestras de sangre de personas aparentemente normales proceden de individuos de ambos sexos, de edades comprendidas entre los 18 y los 25 años. Las muestras patológicas provienen de: a) pacientes diagnosticados de afecciones tumorales; en algunas de estas muestras se han efectuado las determinaciones antes y dos meses después de un tratamiento a base de telegammaterapia con cobalto-60; b) pacientes clínicamente diagnosticados de diferentes tipos de artrosis. Se extrajo la sangre por punción venosa, después de un mínimo de 3 h de ayuno, y se realizaron los ensayos en suero (salvo para el ácido pirúvico, en que se empleó la sangre desproteinizada con ácido tricloracético, o el plasma) inmediatamente, en casi todos los casos, o antes de las 24 h siguientes, por haberse comprobado que la conservación de las muestras en nevera a 0° causaba diferencias de escasa consideración.

Se han empleado en las medidas colorimétricas los aparatos «Spectronic 20» o «Beckman DB-G».

Para la determinación de ácidos siálicos (referidos a NANA) se ha seguido el mé-

todo del resorcinol-cúprico (39) modificado (17), según el modo operatorio habitual de nuestro laboratorio (13). El ácido pirúvico se valoró por el método de FRIEDMAN y HAUGEN (14). Las hexosaminas (referidas a glucosamina) se determinaron por el método de ELSON y MORGAN (12) modificado por RIMINGTON (28), previa hidrólisis con HCl 3n, en ampolla cerrada, durante 4 h en estufa a 100°, condiciones que hemos comprobado son plenamente satisfactorias para este problema. La actividad N-acetil- β -glucosaminidásica se apreció usando como sustrato p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminidósido, según procedimiento indicado en otra publicación (4), con leves modificaciones; a efectos comparativos, se expresó la actividad enzimática por el número de micromoles de p-nitrofenol liberados por 100 mililitros de suero en 30 min, en las circunstancias óptimas de incubación (pH = 4,8, temperatura = 47°).

Resultados

La figura 1 señala los valores medios de las concentraciones de ácidos siálicos, hexosaminas y ácido pirúvico, y de la actividad N-acetil- β -glucosaminidásica de las muestras analizadas, correspondientes a grupos clínicos lo más homogéneos posible. Se observa en ella que las cifras medias de ácidos siálicos, hexosaminas y actividad N-acetil- β -glucosaminidásica pertenecientes a las muestras patológicas son prácticamente superiores, en general, a las normales; no sucede así con los valores de ácido pirúvico. Además, en determinados grupos (tales como F, G, H, L y M) el perfil del diagrama revela un cierto paralelismo entre las concentraciones de ácidos siálicos, hexosaminas y la actividad enzimática citada, si se comparan éstas entre sí; las cifras correspondientes al ácido pirúvico nuevamente se apartan de las anteriores.

* Agradecemos al profesor C. FERREIRÓS y a la doctora M. C. PORTO, de la Facultad de Medicina de Santiago, el suministro de las muestras de sueros patológicos, con indicación del diagnóstico.

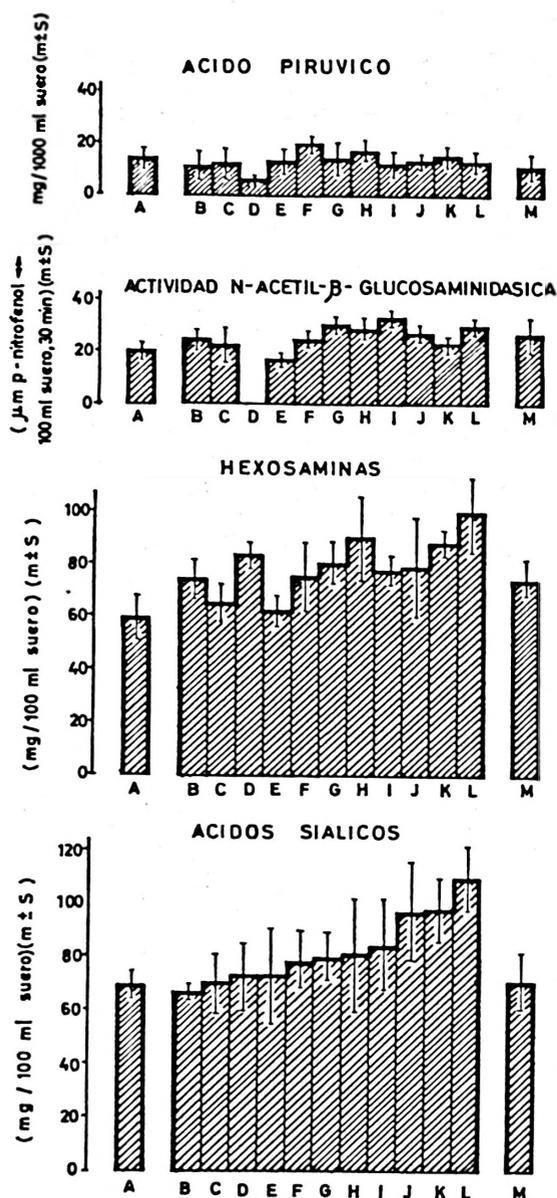


Fig. 1. Concentraciones ($m \pm s$) de ácidos siálicos, hexosaminas, ácido pirúvico y actividad N-acetil- β -glucosaminidásica.

Muestra control: A = adultos normales (21). Muestras patológicas cancerosas: B = labio (3); C = mama (10); E = intestino (3); F = útero (8); G = lengua (7); H = sistema laríngeo-faríngeo (11); I = renal (12); J = sistema linfático (6); K = esófago (5); L = pulmón (9); D = tumor vertebral (2); M = artrosis (9). Entre paréntesis, número de muestras analizadas.

En la tabla I se expresan los valores de los componentes objeto de este estudio, antes y después de someter a los pacientes al tratamiento con telegammaterapia. Se deduce de la misma que las cifras de ácidos acilneuramínicos, salvo en un caso, aumentan considerablemente después del tratamiento; en cambio, todas las de hexosaminas descienden, aunque sea levisimamente; por último, la actividad N-acetil- β -glucosaminidásica y las concentraciones de pirúvico, en unos casos aumentan y en otros disminuyen, de forma irregular.

Discusión

Los valores medios obtenidos para ácidos siálicos en sueros normales concuerdan sensiblemente con los obtenidos por otros autores (1, 2, 3, 5), o resultan algo elevados (2); en este caso, no hay que olvidar, sin embargo, las diferencias propias del método empleado (2) y del patrón usado (13). El aumento general encontrado en los distintos grupos de cáncer coincide con los que tienen lugar en otros trastornos (2, 44); asimismo, se pone de manifiesto una elevación de las tasas de estos ácidos en los sueros de sujetos sometidos a la telegammaterapia, a lo menos poco tiempo después del tratamiento.

En ocasiones, no se aprecia un paralelismo completo entre las cifras de ácidos siálicos y de hexosaminas. Teniendo en cuenta que las valoraciones se refieren a glúcidos pertenecientes a moléculas glucoproteídicas de características distintas, y no a una sola entidad química, es lógico que así suceda; de todos modos, un aumento inespecífico de hexosaminas, más o menos acentuado, es evidente en todos los casos.

Estudios efectuados por WINZLER *et al.* (44), inyectando intravenosamente a ratas glucosamina marcada con C-14 señalan que esta molécula se incorpora en el hígado a las proteínas y aparece después en el

Tabla 1. Concentraciones de ácidos siálicos, hexosaminas y ácido pirúvico, y actividad N-acetil-β-glucosaminidásica, en muestras de pacientes, antes y después de ser sometidos a tratamiento con telegammaterapia.

Muestras	Ácidos siálicos mg/100		Hexosaminas mg/100		Act. N-acetil-glucosaminidásica μm ↔ 100 ml		Ácido pirúvico mg/100	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
Cáncer de:								
mama	69,6	81,6	58,0	57,0	20,0	22,5	1,35	4,27
intestino	75,0	98,4	66,0	63,0	15,0	20,0	1,42	0,90
útero	82,1	103,2	—	—	—	—	1,03	1,01
lengua	81,6	110,0	73,0	72,0	27,5	22,5	0,59	0,99
lengua	84,0	96,0	74,0	73,0	32,5	32,5	0,66	2,25
lengua	84,0	94,0	74,0	73,0	27,5	22,5	1,13	2,34
sistema renal	60,0	65,0	79,0	78,0	32,5	20,0	0,59	0,72
sistema renal	93,6	96,0	83,0	81,0	30,0	22,5	1,71	0,99
sistema renal	79,2	90,0	83,0	82,0	30,0	22,5	0,99	1,01
pulmón	100,8	139,2	84,0	83,0	30,0	20,0	1,33	0,90
Adenocarcinoma de región cervical derecha	69,6	57,5	—	—	30,0	40,0	2,57	1,66
Hodgkin	67,7	130,0	—	—	—	—	2,10	1,78

plasma, existiendo así varios «pools» metabólicos para la misma; además, el 80 % de la radiactividad se recupera en la glucosamina, una escasísima proporción en forma de CO₂ y el resto principalmente como ácido siálico. MALEY *et al.* (10) han comprobado, asimismo, que la inyección intraportal de glucosamina-C-14 a ratas determina la formación de N-acetilglucosamina-6-P, UDP-acetilglucosamina y ácido siálico. Además de en el hígado de rata, en las células de carcinoma ascítico, el mismo WINZLER *et al.* (18) han confirmado que la glucosamina-C-14 era incorporada en macromoléculas y en ácido siálico, siendo intensificada dicha incorporación por el piruvato e inhibida por la glucosa (tal vez en este caso por un mecanismo competidor entre glucosa y glucosamina respecto a la hexoquinasa).

No solamente la glucosamina, sino también la glucosa es un precursor de la molécula de los ácidos siálicos, según ya desde 1956 apreciaron LAUENSTEIN *et al.* (16) y confirmaron más tarde EICHBERG *et al.* (11) incubando cortes de glándula submaxilar ovina con glucosa-C-14; así de-

dujeron la existencia de por lo menos dos «pools» metabólicos distintos para el NANA. Cuando usaban glucosa-C-14 uniformemente marcada, la radiactividad de la molécula del NANA quedaba distribuida aproximadamente a partes iguales entre la porción del piruvato y la de la N-acetilmanosamina resultante de la escisión por la neuraminidolasa. Ahora bien, según RICHMOND (26), la glucosamina se incorpora en las moléculas de los glucidoproteidos más rápida e intensamente que la N-acetilglucosamina y las hexosas. El mismo RICHMOND (27), utilizando también diversos glúcidos sencillos marcados con C-14 en animales intactos, ha llegado a la conclusión de que dichos compuestos aparecen primeramente en forma de azúcar-fosfatos, después como azúcar-nucleótidos y, finalmente, integrando glucidoproteidos; además, parece ser que el NANA libre no es precursor del NANA que forma parte de los glucidoproteidos, sino que este precursor es el CMP-NANA. Por otra parte, las diferencias observadas entre el destino metabólico de los aminoazúcares según se administren oralmente

o por inyección son explicadas por ROBINSON (32) en el sentido de que estos compuestos pueden sufrir una alteración metabólica o una degradación durante la absorción. De todas maneras, también hay que tener en cuenta que la velocidad de absorción de la N-acetilglucosamina por el intestino de rata es menor que la de la glucosa (25).

Otros interesantes aspectos relativos a todos estos problemas del metabolismo de los constituyentes glucídicos de los glucoproteidos han sido últimamente bastante investigados (8, 19, 20, 31, 33-36, 43).

En la que concierne a las cifras de ácido pirúvico, hemos observado que eran sensiblemente las mismas en plasma que en sangre, resultando además concordantes con las obtenidas por otros autores que emplearon el mismo método. Los valores para algunos grupos de cáncer fueron muy similares o coincidentes con los normales.

En resumen, nuestros resultados confirman, en sueros de cancerosos distribuidos según varios grupos, la vinculación estrecha que principalmente los estudios mediante radiosótopos habían encontrado entre las hexosaminas y los ácidos siálicos en diversos materiales biológicos. Parece deducirse, además, una relación de dichas sustancias con la actividad N-acetil- β -glucosaminidásica sérica. Por último, verosímilmente a causa de constituir el ácido pirúvico una compleja encrucijada metabólica, en la que confluyen moléculas de muy varia procedencia, según es sabido, las cifras del mismo no guardan analogía con las de los restantes componentes y actividad enzimática aquí estudiados.

Resumen

Tomando como referencia las concentraciones medias (en mg/100 ml de suero) de ácidos siálicos (expresados como ácido N-acetilneuramínico) (69.2 ± 4.6), hexosaminas (como glucosamina) (59.4 ± 8.2), ácido pirúvico (en plasma)

(1.4 ± 0.4) y la actividad N-acetil- β -glucosaminidásica (20 ± 3.6 μ m de p-nitrofenol liberados por 100 ml de suero en 30 min., a pH = 4,8 y a 47°), determinadas en 21 adultos normales, se han comparado las cifras obtenidas en 76 muestras de pacientes de diversos tipos de cáncer, clasificados en 11 grupos, y en 9 muestras de pacientes de artrosis. Se ha deducido que los valores medios para casi todos los casos patológicos son superiores a los normales en lo que respecta a ácidos siálicos, hexosaminas y actividad N-acetil- β -glucosaminidásica, pero no así en lo concerniente a ácido pirúvico, que presenta una gran variabilidad; además, un cierto paralelismo entre los valores medios de algunos respectivos grupos puede apreciarse también para los ácidos siálicos, las hexosaminas y la actividad enzimática citada. Después de someter a tratamiento a los pacientes con telegammaterapia, las cifras de ácidos siálicos por lo general aumentan bastante, las de hexosaminas descienden muy levemente, y aumentan o disminuyen de forma irregular las de ácido pirúvico y actividad N-acetilglucosaminidásica. Finalmente, se discuten ciertos aspectos relativos al metabolismo de los constituyentes glucídicos de los glucoproteidos plasmáticos.

Bibliografía

1. BÖTTIGER, L. E., y CARLSON, L. A.: *Clin. Chim. Acta*, **5**, 664, 1960.
2. CABEZAS, J. A., VÁZQUEZ-PORTO, J., VÁZQUEZ-PERNAS, R., y PEÑA, J.: *Clin. Chim. Acta*, **7**, 406, 1962.
3. CABEZAS, J. A., VÁZQUEZ-PORTO, J., y FROIS, M. D.: *R. esp. Fisiol.*, **19**, 163, 1963.
4. CABEZAS, J. A., y VÁZQUEZ-PERNAS, R.: *R. esp. Fisiol.*, **25**, 147, 1969.
5. CARTER, A., y MARTIN, N. H.: *J. Clin. Path.*, **15**, 1, 1962.
6. CAYGILL, J. C., y JEVONS, F. R.: *Clin. Chim. Acta*, **11**, 233, 1965.
7. CAYGILL, J. C., y JEVONS, F. R.: *Clin. Chim. Acta*, **13**, 61, 1966.
8. COWAN, N. J., y ROBINSON, G. B.: *Biochem. J.*, **115**, 578, 1969.
9. DANCE, N., PRICE, R. G., ROBINSON, D., y STIRLING, J. L.: *Clin. Chim. Acta*, **24**, 189, 1969.
10. DELGIACCO, R., y MALEY, F.: *J. Biol. Chem.*, **239**, PC2400, 1964.

11. EICHBERG, J., y KARNOVSKY, M. L.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 3827, 1963.
12. ELSON, R. A., y MORGAN, W. T.: *Biochem. J.*, **59**, 638, 1933.
13. FAILLARD, H., y CABEZAS, J. A.: *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, **333**, 266, 1963.
14. FRIEDMAN, T. E., y HAUGEN, G. E.: *J. Biol. Chem.*, **147**, 415, 1943.
15. JORDIAN, G. W., y ROSEMAN, S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **106**, 202, 1963.
16. LAUENSTEIN, K., y ALTMAN, K. I.: *Nature*, **178**, 917, 1956.
17. MIETTINEN, T., y TAKKI-LUUKKAINEN, I. T.: *Acta Chem. Scand.*, **13**, 856, 1957.
18. MOLNAR, J., ROBINSON, G. B., y WINZLER, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 3157, 1964.
19. MOLNAR, J., LUTES, R. A., y WINZLER, R. J.: *Cancer Res.*, **25**, 1438, 1965.
20. MOLNAR, J., ROBINSON, G. B., y WINZLER, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 1882, 1965.
21. PLATT, D.: *Blut*, **15**, 274, 1967.
22. PLATT, D., y HARTMANN, R.: *Klin. Wochenschr.*, **45**, 998, 1967.
23. PLATT, D., PLATT, M.: *Klin Wochenschr.*, **46**, 768, 1968.
24. PLATT, D., PLATT, M., y LOEFFER, H.: *Klin. Wochenschr.*, **16**, 617, 1968.
25. PORTO, E.: Tesina, Fac. Farmacia de Santiago (1966); (FERNÁNDEZ-OTERO, P., PORTO, E., y CABEZAS, J. A.: *R. esp. Fisiol.*, **23**, 141, 1967.
26. RICHMOND, J. E.: *Biochem.*, **2**, 676, 1963.
27. RICHMOND, J. E.: *Biochem.*, **4**, 1834, 1965.
28. RIMINGTON, C.: *Biochem. J.*, **34**, 931, 1940.
29. ROBINSON, D., y STIRLING, J. L.: *Biochem. J.*, **101**, 18P, 1966.
30. ROBINSON, D., y STIRLING, J. L.: *Biochem. J.*, **107**, 321, 1968.
31. ROBINSON, G. B., MOLNAR, J., y WINZLER, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 1134, 1964.
32. ROBINSON, G. B.: *Biochem. J.*, **108**, 275, 1968.
33. ROBINSON, G. B.: *Biochem. J.*, **114**, 635, 1969.
34. ROBINSON, G. B.: *Biochem. J.*, **115**, 1077, 1969.
35. SARCIONE, E. J.: *Biochem.*, **1**, 1132, 1962.
36. SARCIONE, E. J.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **100**, 516, 1963.
37. SCHAUER, R., SCHOOP, H. J., y FAILLARD, H.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **249**, 645, 1968.
38. SCHOOP, H. J., y FAILLARD, H.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **348**, 1518, 1967.
39. SVENNERHOLM, L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 604, 1957.
40. WALKER, P. G., WOOLLEN, M. E., y PUGH, D.: *J. Clin. Pathol.*, **13**, 353, 1960.
41. WARREN, L., BLACKLOW, R. S., y SPEARING, C. W.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **106**, 191, 1963.
42. WARREN, L.: *Proc. 3rd. Intern. Symp. Cer. Sphingolip.*, 1966, pág. 251.
43. WESEMAN, W., y ZILLIKEN, F.: *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 1773, 1967.
44. WINZLER, R. J.: *Clin. Chem.*, **11**, 339, 1965.

