

Ácidos siálicos: distribución, metabolismo y función biológica

Recibido el 3 de octubre de 2007

ÁNGEL REGLERO*, IGNACIO G. BRAVO Y VANESA FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ

Dpto. Biología Molecular. Universidad de León. Campus de Vegazana. 24071. León. Spain.

RESUMEN

Los ácidos siálicos están entre las moléculas de mayor importancia del reino animal encontrándose también en algunos microorganismos. Son cetoácidos con un esqueleto glucídico de nueve carbonos, están cargados negativamente y se descubrieron en mamíferos aunque se encuentran en la mayor parte de los celomados, en protostomados (por ejemplo, artrópodos), y deuterostomados (por ejemplo, cordados y equinodermos). La ruta biosintética del Neu5Ac tiene lugar a través de las siguientes reacciones: a) síntesis de ManAc-6-P, b) síntesis de ManNAc, c) síntesis de Neu5Ac, d) activación del monómero to CMP- β -Neu5Ac, y e) transferencia del Neu5Ac a un aceptor. En el catabolismo de estos compuestos las enzimas neuraminidasa y N-acetil neuraminato liasa tienen un papel importante. En animales los ácidos siálicos están involucrados en interacciones célula-célula e intervienen en la regulación de procesos de reconocimiento celular. En microorganismos están presentes en un número escaso de bacterias y hongos. Estos microorganismos los utilizan para establecer relaciones simbióticas o parasitarias con animales, para utilizarlos como fuente de nitrógeno o carbono o para sialilar su propia superficie.

Palabras clave: Ácido siálico, Neu5Ac, ácido N-acetil-neuramínico.

* **Correspondencia:**

Prof. Dr. Ángel Reglero. Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Dpto. Biología Molecular. Universidad de León. Campus de Vegazana. 24071. León. Spain.

Teléfono: 987 29 12 25

Fax: 987 29 12 26

e-mail: angel.reglero@unileon.es

ABSTRACT

Sialic Acids: Occurrence, Metabolism and Biological function.

Sialic acids are among the most important molecules in the animal kingdom and also occur in some microorganisms. They are α -ketoacids with a nine-carbon glycid backbone. They are negatively charged and they were first discovered in mammals, although it appears that they are present in most *Coelomata* in both protostomes (e.g. *Arthropoda*) and deuterostomes (e.g. *Chordata* or *Echinodermata*). The biosynthetic pathway of Neu5Ac proceeds through the following reactions: a) synthesis of ManAc-6-P, b) synthesis of ManNAc, c) synthesis of Neu5Ac, d) activation of the monomer to CMP- β -Neu5Ac, and e) transfer of Neu5Ac to the acceptor structure. In the catabolism of this compound, the neuraminidase and N-acetyl-neuraminidase activities play important roles. In animals, sialic acids are involved in cell-to-cell interactions and mediate the regulation of recognition process. In microorganisms they are present in a few taxonomically scattered bacterial and fungal species. These microorganisms establish either symbiotic or parasitic relationships with animals and use host sialic acids either as a carbon-nitrogen source or to sialylate their own cell surface.

Key words: Sialic acid, Neu5Ac, N-acetyl-neuraminic acid.

ÁCIDOS SIÁLICOS

Hoy en día, el término ácido siálico comprende una familia de más de 50 compuestos naturales que tienen en común un esqueleto de nueve carbonos (ácido neuramínico), siendo los únicos azúcares de nueve carbonos detectados en procariotas.

El término «ácido siálico» etimológicamente proviene del griego «sialos» cuyo significado es saliva. El compuesto fue descubierto por Blix, en 1936, (1) cuando lo aisló de la mucina bovina de las glándulas submaxilares y por Klenk, en 1941, (2) al aislar un derivado del ácido neuramínico ($C_9H_{17}O_8N$) a partir de glicolípidos del cerebro de enfermos con la enfermedad de Tay-Sachs (asociada a una acumulación de gangliósidos, en particular el GM2, por deficiencia en la enzima *N*-acetil-hexosaminidasa).

El ácido siálico más común es el ácido *N*-acetilneuramínico, $C_{11}H_{19}NO_9$, abreviado habitualmente como Neu5Ac, NeuNAc, NeuAc o NANA. En un principio, los términos ácido siálico y Neu5Ac eran

sinónimos; sin embargo, la aparición en los años 70 de otros compuestos derivados de este último, hizo que a partir de entonces estos términos no se puedan utilizar indistintamente.

ESTRUCTURA DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS

Los ácidos siálicos tienen en su estructura un anillo piranósico constituido por cinco carbonos y un oxígeno formado por un hemiacetal en conformación en silla. En los glicoconjugados que existen en la naturaleza, los ácidos siálicos se presentan sólo en la configuración α excepto en un donador rico en energía, el CMP-ácido siálico, donde el carbono anomérico se encuentra en configuración β . Los ácidos siálicos más abundantes en la naturaleza son el Neu5Ac y el ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc) que difieren en el radical que se encuentra unido al carbono de la posición 5. Existen otros ácidos siálicos generados por modificaciones de los grupos hidroxilo de las posiciones C4, C7, C8 y C9 por acetato, lactato, sulfato, ésteres fosfato o metil ésteres, además de las cuales existen lactonizaciones ínter o intramoleculares en las que están involucradas las posiciones C1 y C5 con lo que se amplía la variedad de estos compuestos (Figura 1).

DISTRIBUCIÓN DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS

En 1990, Woose *et al.* (3) clasificaron los organismos celulares en tres dominios: *Eukarya* (*Animalia*, *Plantae*, *Fungi* y *Protista*), *Bacteria* (*Eubacteria*) y *Archaea* (*Archaeobacteria*). Durante varias décadas se creyó que los ácidos siálicos sólo se sintetizaban en *Deuterostomia* (*Chordata*, *Hemichordata* y *Echinodermata*) y excepcionalmente en otras formas de vida. Sin embargo, la presencia de estos compuestos ha sido demostrada en algunos eucariotas no deuterostomados, en bacterias y por estudios de secuencias genómicas se ha propuesto también su presencia en *Archaea*.

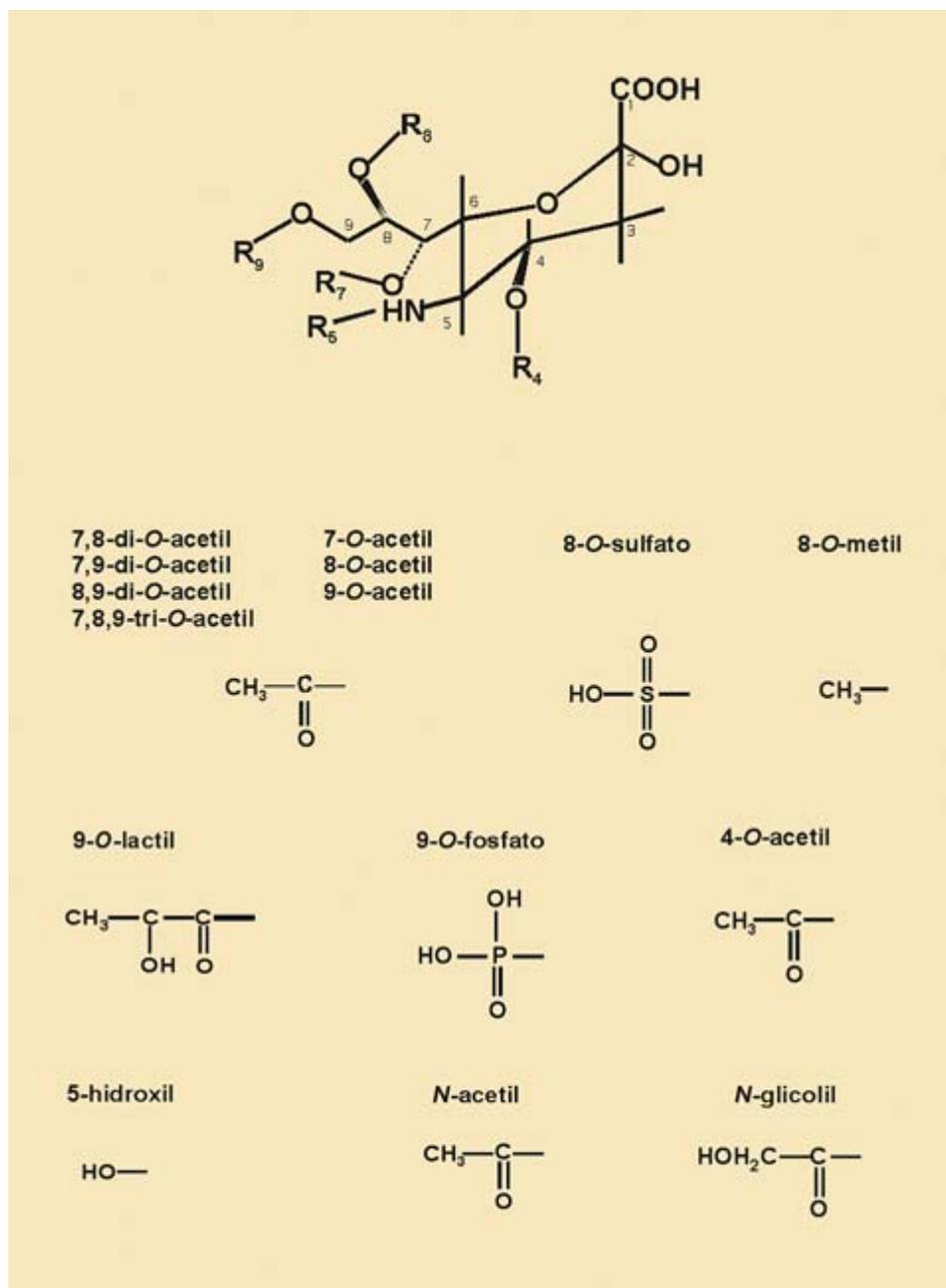


FIGURA 1. Familia de ácidos siálicos presentes en la naturaleza (4, 48).

Eukarya

Animalia

Los deuterostomados sintetizan cuatro tipos de glicoconjugados: glicoproteínas, glicolípidos, proteoglicanos y glicosilfosfatidilinositol. En la mayoría de los casos, los ácidos siálicos ocupan los extremos distales de las cadenas de glicanos con uniones $\alpha(2-3)$ a galactosa, $\alpha(2-6)$ a galactosa y a GalNAc o $\alpha(2-8)$ a otros ácidos siálicos. Existen algunos ejemplos en equinodermos y anfibios donde los ácidos siálicos se encuentran como residuos internos (4).

En los equinodermos se sintetizan tal cantidad de ácidos siálicos modificados que incluso fue posible identificarlos hace años cuando los métodos analíticos que existían eran poco sensibles y poco fiables.

En todos los vertebrados, se han encontrado ácidos siálicos en forma libre o formando parte de estructuras macromoleculares. En forma libre, las concentraciones más elevadas de ácidos siálicos se detectaron en huevos de salmón (5), vesículas seminales de hámster dorado (6) y en extractos de jugo gástrico porcino (7). En el hombre están presentes en el líquido cefalorraquídeo, saliva, suero y orina, pero lo más frecuente es que se encuentren formando parte de estructuras macromoleculares glucídicas tales como glicoproteínas y gangliósidos. En los vertebrados existe menor variedad de ácidos siálicos que en los equinodermos, sin embargo, en tejidos de estos animales se encuentran ácidos siálicos poco habituales como el ácido 8-*O*-metil-Neu5Ac, el Neu5Ac-1,5-lactama y el ácido Neu5Ac-1,7-lactona, compuestos que intervienen en procesos de reconocimiento por selectinas (8, 9).

Los *Protostomia* (*Ecdysozoa* y *Lophotrochozoa*) parecen expresar glicoconjugados similares a los existentes en los deuterostomados. Además, artrópodos tales como insectos y crustáceos presentan un ectoesqueleto de quitina constituido por un polímero de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). Otros estudios han demostrado que algunos insectos pueden expresar Neu5Ac durante las primeras etapas de su desarrollo (10, 11). En todo caso, se desconoce si los protostomados sintetizan sus propios ácidos siálicos o simplemente los incorporan a los glicoconjugados a través de la cadena alimentaria. Así, por

ejemplo, se sabe que *Drosophila melanogaster* no dispone de todos los genes necesarios para la biosíntesis completa de los ácidos siálicos por lo que es necesario que se incorporen algunos de los intermediarios biosintéticos a través de los alimentos (10).

Plantae

Estudios estructurales sobre glicoproteínas naturales y recombinantes de plantas no han demostrado evidencias sobre la presencia de ácidos siálicos en estos organismos, a excepción de la existencia de Neu5Ac localizado mediante espectrometría de masas en el trigo negro (12). Estudios posteriores sugieren que no es posible demostrar inequívocamente la síntesis de ácidos siálicos en plantas, porque las cantidades de estos azúcares detectadas en tejidos vegetales son tan pequeñas que pueden deberse a contaminantes (13).

Fungi

Se han identificado algunos ácidos siálicos como Neu5Ac, Neu5Gc y el ácido 5,9-diacetilneuramínico (Neu5,9Ac₂) en los hongos patógenos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* y *Sporothrix schenckii*, mediante estudios basados en uniones a lectinas capaces de reconocer ácidos siálicos y en espectrometría de masas. El análisis de las secuencias genómicas de algunas de estas especies no ha revelado la presencia de secuencias similares a las implicadas en la biosíntesis, activación o transferencia de los ácidos siálicos en bacterias y mamíferos, aunque es posible que hayan desarrollado una nueva vía de síntesis y expresión que sea específica de cepa como ocurre en muchas bacterias. Alternativamente, los ácidos siálicos pueden ser adquiridos de fuentes externas (12).

Protista

T. cruzi, causante de la enfermedad de Chagas, posee ácidos siálicos que obtiene a partir de glicoproteínas del organismo hospedador por la acción de una proteína llamada trans-sialidasa (14). Además, se han identificado Neu5Ac, Neu5Gc y el ácido 5,7-diacetilneuramínico (Neu5,7Ac₂) en *Dictyostelium discoideum*, *Crithidia*

fasciculata, *Theileria sergenti*, *Entamoeba invadens* y *E. histolytica*, aunque aún se desconoce si estos organismos son capaces de sintetizarlos (12).

Bacteria

En 1957, Barry y Goebel (15) descubrieron, por primera vez, la presencia de ácidos siálicos en *Escherichia coli* K-235 al aislar un polímero de Neu5Ac que fue nombrado posteriormente ácido colomínico.

La mayoría de las bacterias no producen ácidos siálicos, pero varias cepas patógenas entre las que se encuentran *E. coli* K1 (16), *Neisseria meningitidis* (17) y *Campylobacter jejuni* (18) son capaces de biosintetizarlos. Otras bacterias patógenas, como *N. gonorrhoeae* y *Haemophilus* spp., no pueden sintetizarlos, pero se encuentran en sus estructuras, ya que los adquieren desde el organismo hospedador. Además, algunos patógenos pueden catabolizar ácidos siálicos del medio como fuente de carbono, nitrógeno y energía o como fuente de aminoazúcares para biosintetizar la pared celular (19).

Los ácidos siálicos se encuentran, generalmente, formando parte de la estructura capsular de la bacteria y se han detectado en forma de homopolímeros (unidades repetidas de un mismo polímero) o de heteropolímeros (estructuras polisacarídicas formadas por diferentes tipos de monómeros) (20).

Entre las cepas que presentan homopolímeros (Tabla I) se encuentran *E. coli* K1 (15), *N. meningitidis* grupo B (21), *Mannheimia haemolytica* 2 (22) y *Moraxella nonliquefaciens* (23) donde los restos de Neu5Ac están unidos por enlaces glicosídicos $\alpha(2-8)$, en *N. meningitidis* grupo C por enlaces $\alpha(2-9)$ y en *E. coli* K92 por enlaces alternos $\alpha(2-8)$ y $\alpha(2-9)$. Estas bacterias han utilizado los ácidos siálicos para desarrollar estrategias efectivas que les permitan escapar de los mecanismos de defensa del hospedador. Fisiológicamente, los ácidos siálicos localizados en las superficies bacterianas reducen la capacidad defensiva del sistema inmune del hospedador, alterando las actividades de opsonización, citólisis e inflamación que tienen lugar durante una infección bacteriana. Además, dichos ácidos siálicos actúan como garantía de inmunotolerancia, puesto que también son constituyentes mayoritarios de las fracciones glicídicas de algunos

glicopéptidos y glicolípidos localizados en la superficie de las células del hospedador.

TABLA I. *Ácidos siálicos en homopolímeros y heteropolímeros capsulares, y de antígeno O en bacterias.*

<i>Bacterias</i>	<i>Unidades y enlac</i>
Homopolímeros capsulares	
<i>E. coli</i> K1	-8)Neu5Ac $\alpha(2-8)$ Neu5Ac $\alpha(2-$
<i>E. coli</i> K92	-9)Neu5Ac $\alpha(2-8)$ Neu5Ac $\alpha(2-$
<i>N. meningitidis</i> grupo B	-8)Neu5Ac $\alpha(2-8)$ Neu5Ac $\alpha(2-$
<i>N. meningitidis</i> grupo C	-9)Neu5Ac $\alpha(2-9)$ Neu5Ac $\alpha(2-$
<i>M. haemolytica</i> 2	-8)Neu5Ac $\alpha(2-8)$ Neu5Ac $\alpha(2-$
<i>M. nonliquefaciens</i>	-8)Neu5Ac $\alpha(2-8)$ Neu5Ac $\alpha(2-$
Heteropolímeros capsulares	
<i>N. meningitidis</i> grupo W135	-4)Neu5Ac $\alpha(2-6)$ Gal $\beta(1-$
<i>Photobacterium damsela</i> JT0160	Neu5Ac $\alpha(2-3/6)$ Gal $\beta(1-$
<i>N. meningitidis</i> grupo 406Y	-4)Neu5Ac $\alpha(2-3)$ Gal $\beta(1-$
<i>Streptococcus</i> grupo B	Asociado a estructuras glucídicas complejas.
Antígeno	
<i>S. toucra</i> O:48	
<i>S. arizona</i> O:5 y O:29	
<i>S. isazeg</i> O:48	
<i>S. djakarta</i> O:48	
<i>E. coli</i> O:24 y O:56	-7)Neu5Ac $\alpha(2-3)$ Glc $\beta(1-$
<i>C. jejuni</i>	-8)Neu5Ac $\alpha(2-3)$ Gal $\beta(1-$
<i>C. fetus</i>	
<i>V. cholerae</i>	-4)Neu5Ac $\alpha(2-3)$ Gal $\beta(1-$
<i>Hafnia alvei</i> 2	-4)Neu5Ac $\alpha(2-3)$ Glc α
<i>H. ducreyi</i> 35000	Neu5Ac $\alpha(2-3/6)$ Gal $\beta(1-$
<i>C. freundii</i>	
<i>N. meningitidis</i> sp.	Neu5Ac $\alpha(2-3/6)$ Gal $\beta(1-$
<i>N. gonorrhoeae</i>	

Entre las cepas que presentan heteropolímeros (20) (Tabla I) se encuentran *N. meningitidis* W135 cuyos restos de Neu5Ac alternan

con D-glucosa o D-galactosa y *Streptococcus* grupo B donde el Neu5Ac aparece como residuo terminal de estructuras complejas donde existen también otros glúcidos.

También se ha observado que los ácidos siálicos pueden aparecer integrados en las estructuras lipopolisacarídicas de la pared celular (antígeno O), como ocurre en *Citrobacter freundii* O:5, O:29 y O:21; *Salmonella toucra* O:48; *S. arizona* O:5 y *E. coli* O:24 y O:56 entre otras (Tabla I). A pesar de que estas bacterias no parecen tener capacidad para sintetizar ácidos siálicos poseen, en sus membranas, sialiltransferasas específicas capaces de sialilar estructuras polisacarídicas capsulares a partir de CMP-Neu5Ac del hospedador. En estos casos, la sialilación del LPS también confiere a la bacteria capacidad de evadir el sistema inmune del hospedador, adquiriendo un mayor carácter infectivo.

Algunas bacterias sintetizan diferentes tipos de ácidos 3-deoxi-2-ceto-nonulosónico derivados del ácido legionámico originalmente descubierto en el LPS de *Legionella pneumophila* y del ácido pseudámico originalmente descubierto en el LPS de *P. aeruginosa*. Ambos ácidos son similares a los ácidos siálicos en su estructura (24) y probablemente en su biosíntesis. Muchas de las bacterias que expresan estos azúcares son patógenas en humanos, aunque también se han encontrado en bacterias no patógenas tales como *Sinorhizobium fredii* (bacteria simbiótica de leguminosas) (25), *Pseudoaltromonas distincta* (26) y *Pseudomonas. fluorescens* (27). En cambio, estos azúcares no han sido identificados en tejidos humanos.

M. haemolytica 2 presenta un ácido polisiálico formado por unidades de Neu5Ac unidas por enlaces $\alpha(2-8)$ similar al de *N. meningitidis* grupo B y *E. coli* K1, pero con restos de dextrano unidos por enlaces $\alpha(1-4)$ (22).

Archaea

Actualmente, no existen estudios publicados sobre la presencia de ácidos siálicos en integrantes del dominio *Archaea*. En 2002, Angata y Varki (12) encontraron similitud entre secuencias del genoma de *Methanococcus jannaschii* y las secuencias de las enzimas Neu5Ac sintetasa y CMP-Neu5Ac sintetasa, lo que sugiere que este microorganismo podría expresar ácidos siálicos o moléculas similares.

Virus

La frecuencia de los ácidos siálicos en los virus es escasa. Se han detectado en la fracción glicídica de estructuras glicoproteicas localizadas en su envoltura (28, 29). La glicosilación de las mismas se lleva a cabo por acción de las glicosiltransferasas presentes en la célula hospedadora (30). Así, las glicoproteínas virales pueden aparecer sialiladas o no en función de la capacidad de sialilación del organismo portador.

METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS

El estudio de la evolución de las enzimas que participan en el metabolismo de los ácidos siálicos es excitante, ya que hasta hace pocos años se pensaba que estos compuestos sólo existían en organismos superiores y en muy pocas bacterias. Warren, en 1963, (5) utilizando métodos químicos, determinó la distribución filogenética de los ácidos siálicos. Sus resultados indican que la síntesis de estos monosacáridos está limitada al complejo de los metazoanos del linaje de los deuterostomados, ya que ni las plantas ni los protostomados ni tampoco los hongos tienen cantidades detectables, sugiriendo que la evolución de la ruta biosintética de los ácidos siálicos ocurrió cerca de la divergencia de los celomados (protostomados y deuterostomados) aproximadamente hace 500 millones de años. La puesta a punto de nuevos métodos analíticos, así como la secuenciación completa del genoma de numerosas especies ha ampliado considerablemente el conocimiento que se tiene hoy día sobre la evolución de los ácidos siálicos.

Los ácidos siálicos son α -cetoácidos con un esqueleto de nueve carbonos en la cadena principal. Asimismo, existen otros α -cetoácidos con un esqueleto de ocho carbonos (ácido ceto-desoxi-octulosónico) y de siete carbonos (ácido desoxi-arabino-heptulosónico). Todos ellos son sintetizados por la adición de fosfoenolpiruvato (PEP) a un esqueleto glicídico de seis, cinco y cuatro carbonos respectivamente. Esta reacción de síntesis no es habitual, ya que procede por ruptura del enlace C-O en lugar de por ruptura del enlace P-O, más general. La similitud en la química de la reacción catalizada, así como las semejanzas a nivel de secuencia entre estas enzimas sugie-

re que todas ellas tienen un ancestro común. El metabolismo de los ácidos siálicos podría así haber evolucionado a partir de elementos pre-existentes implicados en la síntesis de aminoácidos aromáticos *via* shikimato. El escenario evolutivo propuesto para la aparición y evolución de la ruta de síntesis de los ácidos siálicos, y que explica también la distribución taxonómica de las especies que poseen ácidos siálicos en sus estructuras implica eventos de transferencia génica horizontal, como se indica a continuación (31, 32):

— Las 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico (KDO)-P sintasas y las Neu5Ac-P sintasas (y posiblemente las 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonulosónico (KDN)-P sintasas) han evolucionado a partir de desoxiarabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) sintasas procarióticas.

— En un proceso de transferencia génica horizontal, un ancestro de los celomados recibió una versión ancestral de una ceto-ácido sintasa y de una citidililtransferasa, desde un progenote bacteriano, posiblemente, en el linaje de *Clostridium tepidum* o de *Bradyrhizobium japonicum*.

— En el linaje de los celomados los genes transferidos evolucionaron generando la ruta de síntesis de ceto-ácidos de nueve carbonos, que dio lugar, finalmente, a los ácidos siálicos actuales.

— Recientemente, y quizá de manera independiente, diferentes organismos patógenos han aceptado por transferencia génica horizontal a partir de sus hospedadores algunos de los genes de la ruta de síntesis de ácidos siálicos. Ello les ha comportado ventajas evolutivas en términos metabólicos y/o de defensa ante la respuesta inmune.

— En un ancestro de proteobacteria los genes de síntesis y activación de ceto-ácidos dieron lugar a la ruta de síntesis de ceto-ácidos de ocho carbonos. El paradigma de estas moléculas es el KDO, que aparece formando parte de estructuras de la pared celular bacteriana, ejemplificadas en el LPS.

— Un ancestro de plantas recibió, posiblemente, desde un ancestro de *Chlamydiae*, los genes de síntesis del KDO. Estos glúcidos se incorporaron también a las estructuras de la pared celular de plantas, ejemplificadas en las pectinas.

Actualmente, las principales rutas en el metabolismo de los ácidos siálicos han sido elucidadas por diferentes grupos de investigación (4, 14, 33, 34).

Desde el punto de vista biosintético todos los ácidos siálicos, a excepción de algunos azúcares sialilados específicos de ciertas bacterias, derivan del ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonulósico (KDN) y del Neu5Ac (35). La ruta para sintetizar ambos compuestos parece ser muy similar (36, 37), aunque las enzimas implicadas en la síntesis de KDN no están bien caracterizadas.

METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS EN EUKARIOTAS

Biosíntesis

Como se muestra en la Figura 2, la biosíntesis de Neu5Ac comienza con la formación de *N*-acetil-D-manosamina (ManNAc) desde UDP-*N*-acetil-D-glucosamina (UDP-GlcNAc) en el citosol, por acción de la enzima UDP-GlcNAc-2-epimerasa. La ManNAc es fosfo-

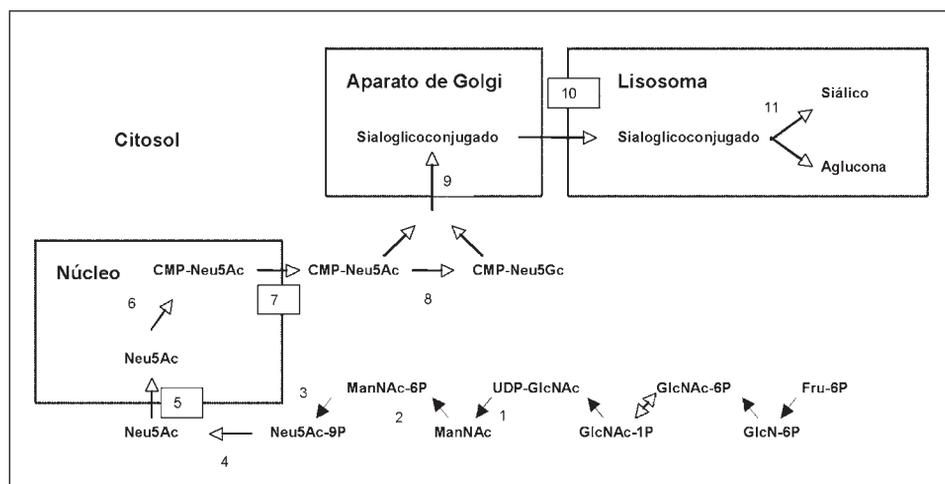


FIGURA 2. *Metabolismo de ácidos siálicos en eucariotas.* 1, UDP-GlcNAc-2-epimerasa; 2, ManNAc quinasa; 3, Neu5Ac-9P sintasa; 4, Neu5Ac-9P fosfatasa; 5, 7 y 10, Permeasa; 6, CMP-Neu5Ac sintetasa; 8, Hidroxilasa; 9, Sialiltransferasa; 11, Neuraminidasa.

rilada mediante ManNAc kinasa obteniéndose *N*-acetil-D-manosamina-6-fosfato (ManNAc-6P) que posteriormente se condensa con el fosfoenolpiruvato para generar ácido *N*-acetilneuramínico-9-fosfato (Neu5Ac-9P) mediante la Neu5Ac-9P sintasa. Este último compuesto (Neu5Ac-9P) es desfosforilado para obtener Neu5Ac por la enzima Neu5Ac-9P fosfatasa. La forma activa de ácido siálico, CMP-ácido siálico, es generada a partir de citidín trifosfato (CTP) y Neu5Ac en el núcleo mediante la CMP-Neu5Ac sintetasa. En su itinerario, el CMP-Neu5Ac puede ser modificado a CMP-Neu5Gc por la enzima CMP-NeuAc hidroxilasa en el citosol. El CMP-ácido siálico (CMP-Neu5Ac y CMP-Neu5Gc) es el sustrato de las sialiltransferasas que incorporan los cetoácidos en cadenas nacientes de glicoproteínas y glicolípidos en el aparato de Golgi. Existe una familia numerosa de sialiltransferasas (38) donde los distintos miembros de la misma difieren en su especificidad hacia el glicano aceptor y el ácido siálico unido a éste (Figura 2).

Degradación

La degradación de sialilglicoconjugados normalmente comienza con la hidrólisis de los sialoconjugados por la acción de sialidasas extra o intracelulares. Las endo-sialidasas hidrolizan enlaces internos de los ácidos siálicos, mientras que las exo-sialidasas atacan los enlaces terminales de estos y desialilan glicoproteínas, glicopéptidos, gangliósidos, oligosacáridos y polisacáridos (39). La presencia de sustituyentes en los ácidos siálicos requiere la actuación previa de otras enzimas, por ejemplo, los grupos *O*-acetilo han de ser eliminados por esterasas, enzimas que están presentes en muchos tejidos (40, 41).

Estudios realizados acerca de la vida media de glicoproteínas de las membranas celulares sugieren que al menos parte de los glicoconjugados son resialilados en el aparato de Golgi regresando posteriormente a la superficie celular (42, 43, 44). Si los glicoconjugados son transportados a los lisosomas, las sialidasas lisosomales eliminarán ácidos siálicos que serán conducidos específicamente al citosol donde pueden ser reutilizados o degradados por una aldolasa citosólica (45).

Existe una sialidasa especializada, trans-sialidasa, que transfiere residuos de ácidos siálicos directamente desde un glicano a otro, evitando así la formación de un intermediario rico en energía, el CMP-ácido siálico (46, 47). Esta reacción enzimática tiene lugar en muy pocos microorganismos entre los que se destacan los tripanosomas africanos y americanos (48).

METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS EN BACTERIAS

Biosíntesis

La biosíntesis de los ácidos siálicos en bacterias se inicia por medio de los precursores comunes del metabolismo intermediario (Figura 3). A partir de D-glucosa se obtiene D-fructosa-6-fosfato (Fru-6P) que posteriormente se convierte en D-glucosamina-6-fosfato (GlcN-6P) que es acetilada para generar *N*-acetil-D-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6P) la cual, por acción de la enzima GlcNAc-6P-2-epimerasa, es epimerizada a ManNAc-6P. Posteriormente, ManNAc-6P es desfosforilada a ManNAc (49, 50), aunque otros autores (51) han indicado una ruta paralela a la citada en eucariotas donde ManNAc se obtiene desde UDP-GlcNAc. La síntesis de Neu5Ac parece ser diferente según el microorganismo donde se estudie. Así, se ha visto que en *E. coli* K1, *E. coli* K92 y *M. haemolytica* 2, la enzima Neu5Ac liasa condensa ManNAc con piruvato para generar Neu5Ac (45, 52, 53, 54), mientras que en otras cepas de *E. coli* y en *N. meningitidis* la síntesis de Neu5Ac se realiza por condensación de ManNAc con PEP mediante la enzima Neu5Ac sintetasa (21, 55, 56). Independientemente de la ruta de síntesis, el Neu5Ac libre es activado (CMP-Neu5Ac) por acción de la enzima CMP-Neu5Ac transferasa. El paso final en la biosíntesis de sialoglicoconjugados es realizado por sialiltransferasas que incorporan el Neu5Ac a un sustrato aceptor. En *E. coli* K1 el aceptor es la cadena de ácido polisiálico naciente, mientras que *N. meningitidis* presenta, al menos, dos sialiltransferasas para sintetizar ácido polisiálico y sialilar lipooligosacáridos (LOS), siendo estos últimos LPS que carecen de la cadena antígeno O (12, 57).

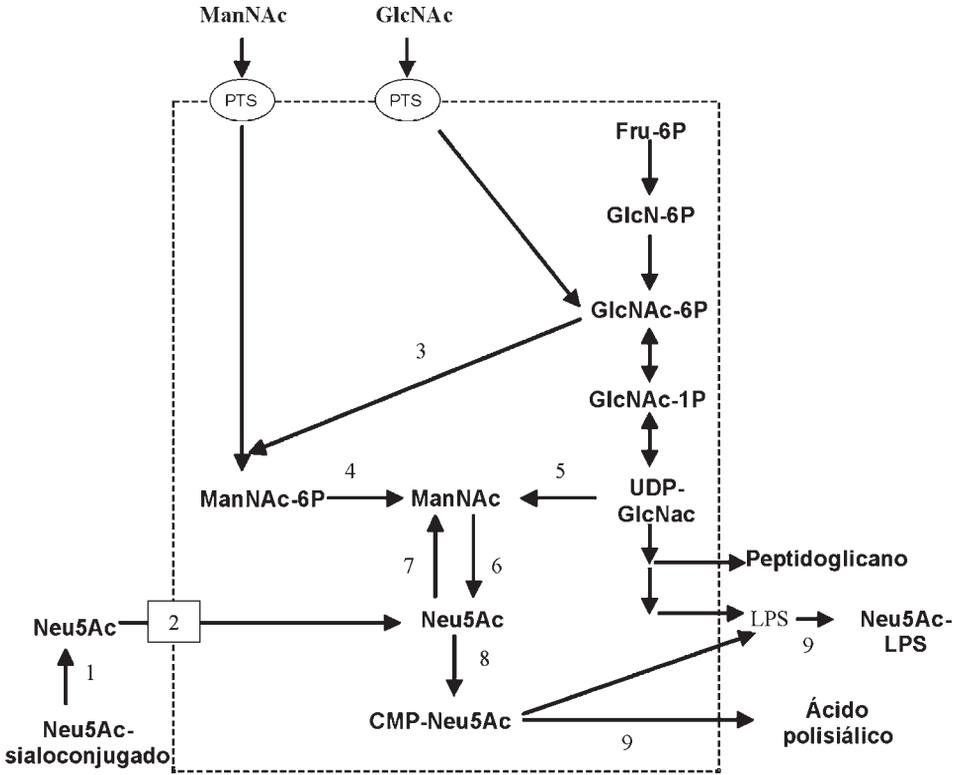


FIGURA 3. *Metabolismo de Neu5Ac en bacterias.* 1: Neuraminidasa; 2: Permeasa; 3: GlcNAc-6P-2-epimerasa; 4: Fosfatasa; 5: UDP-GlcNAc-2-epimerasa; 6: Neu5Ac sintetasa; 7: Neu5Ac liasa; 8: CMP-Neu5Ac sintetasa; 9: Sialiltransferasa.

Degradación

Existen dos enzimas importantes en la degradación de los ácidos siálicos en bacterias: la Neu5Ac liasa y la sialidasa o neuraminidasa (Ver Figura 3).

a) Neu5Ac liasa

La N-acetil-neuraminato-liasa (N-acetil-neuraminato piruvato liasa, ácido-N-acetilneraninato aldolasa, EC.4.1.3.3) convierte el Neu5Ac en ManNAc y piruvato de forma reversible. La primera cita

de esta enzima fue dada en los años 1950 en *C. perfringens* (58) y *Vibrio cholerae* (59). La enzima ha sido purificada de *E. coli*, (60) *C. perfringens* (61) y *H. influenzae* (62). Las enzimas de *E. coli* y *H. influenzae* han sido cristalizadas y su estructura ha sido determinada (63). La estructura muestra que en *E. coli* la enzima es un tetrámero contrariamente a los resultados obtenidos por gel filtración que señalan que la enzima es un trímero. Esta proteína juega un papel primordial en el metabolismo de ácidos siálicos ya que puede regular la concentración intracelular de este metabolito y por lo tanto la concentración de CMP-Neu5Ac, por lo que esta liasa tiene una importante función catabólica en la detoxificación del Neu5Ac (64).

In Vitro, esta enzima tiene como sustratos el Neu5Ac y algunos de sus derivados (65). Vimr *et al* concluyen que la regulación de la enzima es necesaria no solamente para la degradación de los ácidos siálicos sino también para regular la concentración de los intermediarios en la ruta metabólica de estos compuestos (57, 64).

b) Sialidasa o Neuraminidasa

En 1941, Hirst (66) descubrió, por primera vez, actividad sialidásica mientras estudiaba la hemoaglutinación en presencia del virus influenza. Posteriormente (1946), Burnet *et al.* (67) identificaron una sialidasa bacteriana como enzima destructora de receptor. Los términos «sialidasa» y «neuraminidasa» fueron propuestos por Heimer y Meyer (1956) (68) y Gottschalk (1957) (69) respectivamente. El término «sialidasa» fue incluido en la nomenclatura IUB (Unión Internacional de Bioquímica) en el primer informe de la Comisión de Enzimas, en 1961, con el nombre de «neuraminidasa» (IUB, 1961). Este término se mantuvo en los informes de las ediciones de 1964 (IUB, 1964), 1972 (IUB, 1972) y 1978 (IUB, 1978). En 1976, Rosenberg y Schengrund (70) señalaron que el término «sialidasa» era el más apropiado para describir estas enzimas. En 1983, Cabezas *et al.* (71) propusieron el término «sialidasa» para las enzimas eucarióticas y el término «neuraminidasa» para las enzimas procarióticas. En la edición de 1984 (IUB, 1984), el término recomendado fue «sialidasa», quedando limitado el término «neuraminidasa» al epígrafe de «otro nombre», posiblemente, debido a que el Neu5Ac no es sustrato de la enzima, pero sí lo son aquellos compuestos en los que

están presentes residuos de ácidos siálicos. En 1991, Cabezas describió la nomenclatura IUB para las sialidasas (72).

La neuraminidasa (sialidasa, N-acilneuraminosil glicohidrolasa, EC 3.2.1.18) es una exoglicosidasa que hidroliza los enlaces α -glicosídicos de los ácidos siálicos que se encuentran unidos en posición terminal a glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos en animales superiores y en algunos microorganismos (14, 73).

Las neuraminidasas se encuentran frecuentemente en bacterias que tienen contacto estrecho con un hospedador animal, donde la enzima sirve como factor de colonización y virulencia (74), además de posibilitar la utilización de los ácidos siálicos como fuente de carbono y energía. Han sido detectadas en especies de *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, además de *Bacteroides fragilis*, *A. viscosus*, *V. cholerae*, *S. typhimurium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Bifidobacterium bifidus*, *H. parasuis* y *A. pyogenes* (20).

Vimr (73) clasificó las neuraminidasas bacterianas en dos familias, en función del peso molecular. La primera incluye neuraminidasas de bajo peso molecular, en torno a 40 kDa, y la segunda neuraminidasas con un peso molecular próximo a 80 kDa (grandes neuraminidasas). Se ha de citar la gran controversia que existe en cuanto a los pesos moleculares de las neuraminidasas, así en *P. multocida* han sido estimados pesos entre los 36 y 500 kDa (75, 76).

Algunas neuraminidasas son secretadas como proteínas solubles, en cambio, otras están asociadas a fracciones de membrana como la neuraminidasa de *Haemophilus parasuis* (77). En algunas bacterias se han identificado varias neuraminidasas, por ejemplo, *C. perfringens* tiene dos neuraminidasas una de las cuales tiene una masa molecular de 71 kDa y es secretada, y la otra con 43 kDa permanece en la célula (78).

Las neuraminidasas comparten una pequeña parte de la secuencia idéntica, 30%, además de tener dos secuencias conservadas, la primera denominada RIP/RLP (Arg-Ile/Leu-Pro) y la segunda caja-Asp (Ser/Thr-X-Asp-[X]-Gly-X-Thr-Trp/Phe; donde la X representa cualquier aminoácido). Estas secuencias pueden aparecer varias veces a lo largo de la cadena (79) Estudios realizados sobre varias

neuraminidasas bacterianas han revelado una superfamilia de enzimas con multidominios ensamblados alrededor del pliegue de hélice β (80, 81, 82). En la Figura 4 se observa la estructura de la neuraminidasa de *Salmonella thiphimurium* y en la Figura 5 se comparan las estructuras secundarias de varias neuraminidasas (20).



FIGURA 4. *Estructura tridimensional de la neuraminidasa de S. typhimurium.* Se muestran las α -hélices, las cadenas β y la zona sin estructura secundaria definida (9). Pueden observarse las seis hojas que conforman la «hélice propulsora, (6-bladed beta-propeller)».

Mecanismo enzimático

El término *N*-acetilneuraminosil glicohidrolasa, también sialidasa o neuraminidasa, incluye un gran número de enzimas cuya frecuencia y cuantía de sustratos específicos indica su importancia en el metabolismo de los ácidos siálicos (70, 83, 84, 85).

a) Especificidad anomérica. Las sialidasas liberan los ácidos siálicos que se encuentran unidos por enlaces α -glicosídicos en los sialocompuestos (86). En la naturaleza, los ácidos siálicos se encuentran en sialoconjugados en conformación α -glicosídica con la

excepción del CMP-Neu5Ac que es un β -glicósido por lo que este último compuesto no es un sustrato para las neuraminidasas.

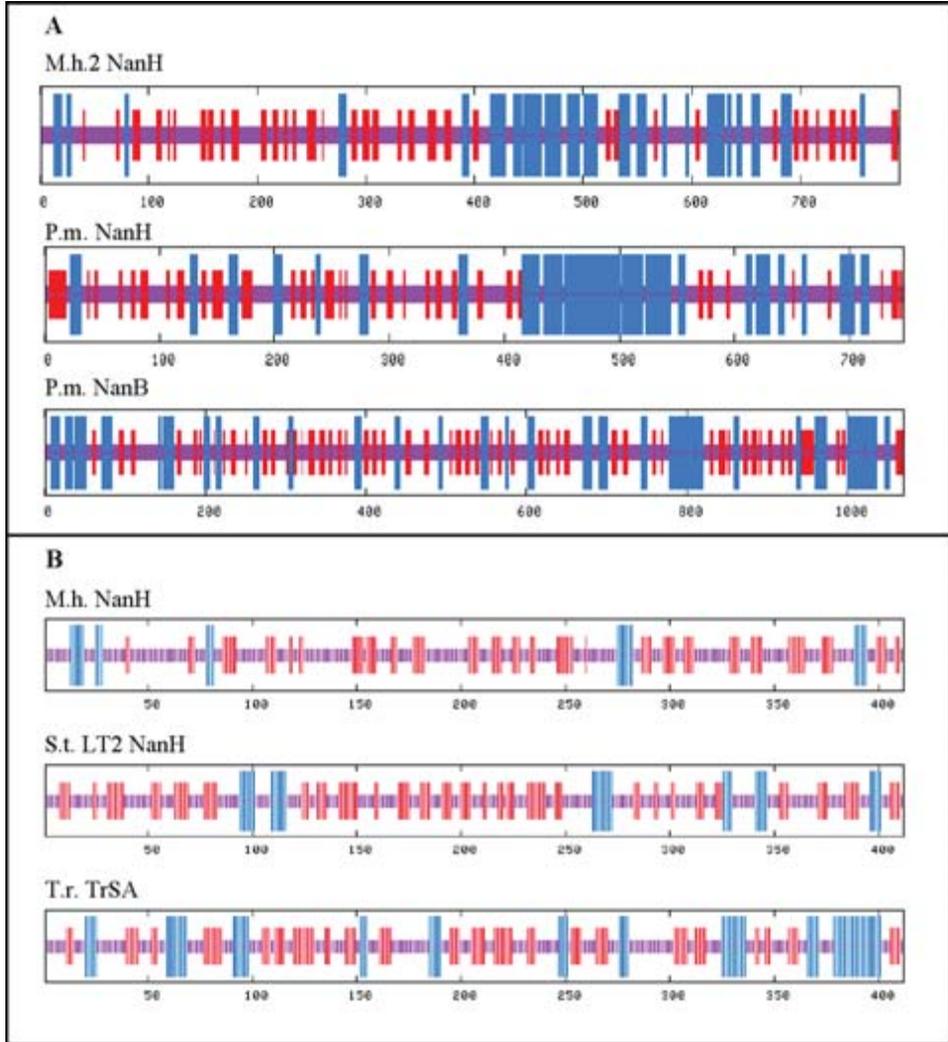


FIGURA 5. Predicción de la estructura secundaria de la neuraminidas (NanH) de *M. haemolytica* 2 mediante el método GOR IV. **A**) Comparación de la estructura secundaria de la neuraminidasa (NanH) de *M. haemolytica* 2 con las neuraminidasas NanH y NanB de *P. multocida*. **B**) Comparación de la estructura secundaria de la neuraminidasa de *M. haemolytica* 2 con las neuraminidasas NanH de *S. typhimurium* LT2 y TrSA de *T. rangeli*. Símbolos: hélice (■), lámina (■) y cola (■) (20).

b) El grupo carboxilo. Las sialidasas requieren para su actividad catalítica que el ácido siálico del α -sialoglicoconjugado tenga un grupo carboxilo cargado negativamente. Por ejemplo, en el ácido colomínico, los ésteres internos que se forman entre el grupo carboxilo y los grupos hidroxilo C7 o C9 impiden la acción de las sialidasas (87) lo cual puede ser evitado por saponificación (88). En este sentido, la sialidasa de *V. cholerae* tampoco hidroliza los metil ésteres de los ácidos siálicos que se encuentran en las glicoproteínas existentes en la secreción de la glándula submaxilar del ganado bovino (84). También es conocido que la reducción de la función carboxilo a alcohol primario y la preparación de la benzil- α -*N*-acetil-D-nonulosamina o el correspondiente II³Neu5AcLac derivado inhibe la acción de las sialidasas de mamíferos, de virus y de bacterias (89).

c) N-sustitución. La naturaleza de los *N*-sustituyentes en los glicósidos de ácidos siálicos tiene una marcada influencia en la velocidad de hidrólisis de las sialidasas. Las modificaciones de los *N*-sustituyentes para originar residuos pequeños como el ácido *N*-formilneuramínico (90) o grandes como el ácido *N*-propionilneuramínico (14) y el ácido *N*-carbобензоxineuramínico (91) producen una disminución en el grado de hidrólisis de los glicósidos de los ácidos *N*-formil y *N*-propionil neuramínico, y una inhibición total en los *N*-carbобензоxi derivados.

d) O-sustitución. En la mayoría de las sialidasas se ha observado una disminución de la velocidad de hidrólisis de los enlaces en los que se encuentran implicados ácidos siálicos *O*-acetilados (92). La acetilación del grupo hidroxilo del C4 de la molécula de ácido siálico ha demostrado el bloqueo en la acción de las sialidasas. Las sialidasas virales son capaces de liberar cantidades bajas, pero significativas, de ácidos siálicos 4-*O*-acetilados a diferencia de lo que ocurre con las sialidasas de cerebro, corazón e hígado humanas o las de hígado de caballo (92).

e) Longitud de las cadenas laterales. La influencia de las cadenas laterales (C7 a C9) de la molécula de ácido siálico en la acción de las sialidasas ha sido demostrada, de modo que el progresivo acortamiento de la cadena permite una disminución en la velocidad de la hidrólisis de las sialidasas (93, 94). Se ha observado, en algunos casos, la resistencia a la hidrólisis por las sialidasas de aquellos

enlaces en los que los ácidos siálicos se encuentran en cadenas ramificadas en oligosacáridos.

f) Influencia de la fracción no glicánica. Se ha observado que la fracción no glicánica de los sustratos sintéticos de las sialidasas no influye en la velocidad de hidrólisis de las enzimas de *V. cholerae* y del virus influenza (14). También es conocido que la introducción de una carga positiva en la fracción no glicánica conduce a un incremento de los valores de la Km en la sialidasa de *V. cholerae*. Algunos estudios han destacado la existencia de un centro hidrofóbico distinto del centro catalítico tanto en la sialidasa de *V. cholerae* como en la enzima de *C. perfringens* (14). Estas observaciones han sido apoyadas por estudios realizados con sialidasas de mamíferos, protozoos y bacterias en los que se observó que las enzimas que demostraban afinidad por el ácido *N*-(4-nitrofenil) oxámico (ligando muy hidrofóbico) también demostraban baja actividad sialidásica en sustratos sintéticos con fracciones no glicánicas hidrofóbicas, mientras que las enzimas que no tenían tal afinidad hidrolizaban los sustratos sintéticos rápidamente tanto si tenían como si no fracciones no glicánicas hidrofóbicas (95).

g) Enlaces glicosídicos. La presencia de enlaces $\alpha(2-3)$, $\alpha(2-6)$ y $\alpha(2-8)$ en diferentes carbohidratos ha suscitado una serie de cuestiones acerca de la especificidad de las sialidasas frente a diferentes enlaces glicosídicos. Se sabe que las sialidasas virales hidrolizan los enlaces $\alpha(2-3)$ a mayor velocidad que la que realizan sobre uniones $\alpha(2-6)$, mientras que la velocidad de hidrólisis de los enlaces $\alpha(2-8)$ es entre moderada y escasa en diferentes sialidasas víricas (83, 96). Las sialidasas bacterianas tienen especificidad glicosídica menos marcada que la existente en las enzimas virales, llegando sólo a ser significativa a concentraciones bajas de la enzima (70, 83, 96). En cuanto a las sialidasas de mamíferos no existen muchos estudios sobre estos aspectos, pero algunos resultados sugieren que existe el mismo tipo de especificidad (14). Posteriormente, estudios realizados sobre el trabajo de (83, 96) establecieron diferencias entre actividades sialidásicas virales en función de los diferentes enlaces existentes $\alpha(2-3)$ y $\alpha(2-6)$, y de la naturaleza de la cadena oligosacáridica en los sustratos.

h) pH óptimo. El pH óptimo de las sialidasas bacterianas y víricas se encuentra, generalmente, en el intervalo de valores de pH

entre 5 y 6. Las variaciones en el mismo, dependen de la naturaleza del sustrato (97) la naturaleza de la solución amortiguadora (839 y la fuerza iónica cuando se hidrolizan sustratos glicolipídicos (98).

i) Activadores e inhibidores. Diversos estudios han demostrado que algunas sialidasas requieren cationes divalentes, siendo el más efectivo el Ca^{2+} , para su actividad enzimática (83, 96). En el caso de la sialidasa de *V. cholerae* los iones Ca^{2+} influyen más en la estabilidad de la enzima que en la unión enzima-sustrato.

Los compuestos inhibidores de la enzima sialidasa pueden ser divididos en cuatro grupos: 1) compuestos naturales de alto peso molecular; 2) compuestos naturales de bajo peso molecular; 3) compuestos sintéticos y 4) iones inorgánicos y EDTA (14).

MECANISMOS DE SIALILACIÓN DE LA SUPERFICIE CELULAR EN MICROORGANISMOS

Los microorganismos que modifican sus superficies celulares con ácidos siálicos frecuentemente no son reconocidos como agentes extraños por el hospedador por lo que son capaces de evitar o inhibir la respuesta inmune (57). Se han descrito cuatro mecanismos de sialilación de la superficie celular en microorganismos (99).

Síntesis «de novo»

Como se ha citado anteriormente, la mayoría de las bacterias no son capaces de sintetizar ácidos siálicos. *E. coli* K1 y *N. meningitidis* fueron los primeros microorganismos en los que se demostró la síntesis de Neu5Ac desde metabolitos simples (ver Tabla II). Los genes que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis, activación y polimerización de Neu5Ac están localizados en un fragmento de ADN de 17-19 kb que puede diferenciarse en tres regiones (100, 101).

TABLA II. *Resumen del metabolismo de ácidos siálicos en microorganismos (56).*

Clase	Microorganismo	Ácido siálico	Referencia
1	La mayoría de las cepas de <i>E. coli</i> <i>V. cholerae</i> <i>S. enterica</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>C. perfringens</i> <i>Viridans Streptococci</i> <i>B. fragilis</i> <i>Actynomices</i> Otros	Microorganismos que degradan, pero normalmente no sintetizan ni usan ácido siálico exógeno para decorar su superficie celular.	(19)
2	<i>S. agalactiae</i> <i>S. schenckii</i> <i>T. cruzi</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> <i>T. brucei</i> <i>Fonsecaea pedrosoi</i> <i>Endotrypanum spp.</i> <i>C. neoformans</i> <i>N. meningitidis</i> <i>C. albicans</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>A. fumigatus</i> <i>Pneumocystis carinii</i>	Microorganismos que no degradan ácidos siálicos, pero existe biosíntesis desde metabolitos simples. En el caso de <i>gonococcus</i> se obtienen desde el hospedador, mientras que <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i> disponen del mecanismo de transglicosilación.	(103, 104)
3	<i>3H. influenzae</i> <i>P. multocida</i> Otros <i>Haemophilus</i> , <i>Actinobacillus</i> y <i>Pasteurella (HAP)</i> <i>C. diphtheriae</i>	Microorganismos capaces de degradar y obtener ácidos siálicos exógenos.	(108-110)
4	<i>E. coli K1</i> y <i>K92</i> Algunas <i>S. enterica spp.</i> <i>M. haemolytica 2</i>	Microorganismos capaces de degradar y biosintetizar ácidos siálicos desde metabolitos simples.	(111)

«Donor scavenging»

El segundo mecanismo de sialilación de la superficie celular fue descubierto en algunas cepas de *gonococci* causantes de la enfermedad de transmisión sexual, gonorrea en humanos (102). Harry Smith y sus colaboradores en Birmingham (Reino Unido) observaron que algunas cepas de *N. gonorrhoeae* perdían la resistencia al suero humano tras resiembras en el laboratorio en medios de cultivo tradicionales (57). Esta pérdida de resistencia se restablecía cuando las cepas eran crecidas en suero, lo que sugiere que en éste se encontraba el factor limitante que hacía que las cepas perdieran su virulencia. Diversos ensayos demostraron que este factor era el compuesto CMP-Neu5Ac existente en el suero y que es el sustrato de una sialiltransferasa de la superficie celular de *N. gonorrhoeae*. Por tanto, *N. gonorrhoeae* utiliza este método de sialilación a partir de una sialiltransferasa extracelular (103, 104) (ver Tabla II) y de CMP-Neu5Ac existente en pequeñas cantidades como un constituyente normal en las secreciones humanas. Además, la sialiltransferasa gonococcal es homóloga a una sialiltransferasa de *N. meningitidis* relacionada con la sialilación del LOS, está asociada a membrana y expuesta a la superficie celular donde tiene acceso al CMP-Neu5Ac presente en el suero (105).

Trans-sialidasa

El tercer mecanismo de sialilación de la superficie celular fue propuesto, primero, para *Trypanosoma cruzi* (106) que expresa una sialidasa, pero no sintetiza ni cataboliza ácidos siálicos libres, y más tarde para *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, *T. brucei brucei*, *T. congolense* (107), y *Corynebacterium diphtheriae* (108). En estos casos, una(s) sialidasa(s) de la superficie que normalmente funciona en el sentido de la hidrólisis puede transferir ácidos siálicos teniendo como aceptor bien un residuo de una galactosa o bien *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc) terminal de lactosa o lactosamina respectivamente (108, 109, 110) (Ver Tabla II). Esta actividad sialiltransferásica de la sialidasa es tanto mayor que su actividad hidrolítica cuanto mayor sea la disponibilidad de aceptor galactosil. Este mecanismo hace que *T. cruzi* pueda sialilar la superficie celular del pará-

sito, las células que le rodean y los glicoconjugados del suero, utilizando los sialoglicoconjugados del hospedador como donadores de los restos de ácido siálico en lugar de utilizar el CMP-siálico.

«Precursor scavenging»

El mecanismo más reciente de sialilación de la superficie celular, «precursor scavenging», ha sido elucidado por análisis fenotípico de mutantes *nanA* de *H. influenzae*. Este microorganismo codifica una CMP-Neu5Ac sintetasa y al menos una sialiltransferasa, pero carece de los genes de biosíntesis de ácidos siálicos (111) (Tabla II). *H. influenzae* transporta ácidos siálicos desde el hospedador y bien los degrada a ManNAc y piruvato o bien los activa a CMP-ácido siálico para posteriormente sialiltransferirlos al LOS acceptor (57). Este mecanismo ha sido confirmado para *H. ducreyi*. En dicho estudio, los autores explican que las concentraciones fisiológicas de Neu5Ac en el hospedador son suficientes para completar la sialilación del LOS de esta cepa (112).

ÁCIDOS SIÁLICOS Y VIRULENCIA

La función e importancia de los restos de ácidos siálicos de los glicoconjugados bacterianos es bien conocida, la sialilación del núcleo oligosacárido del lipolisacárido (LOS) influyen la susceptibilidad a la actividad bactericida presente en los antisueros y además actúa sobre la activación del complemento. Los LOS de bacterias patógenas como *N. meningitidis*, *N. gonorrhoea*, *H. ducreyi*, *H. influenzae*, *Moxarella catarrhalis*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*, mimetizan los restos oligosacáridos de los glicoesfingolípidos presentes en las células animales, además estos LOS son química y antigénicamente idénticos a las fracciones oligosacáridas de algunos gangliósidos y de antígenos de grupos sanguíneos (113, 114, 115, 116, 117). Este mimetismo molecular por lo tanto tiene gran importancia en la patogenicidad de estas bacterias ayudándolas a evadir el sistema inmune de los animales. Wetzler *et al* (118) indican que los LOS sialilados de gonococos hacen a estos microorganismos resistentes a la acción bactericida del suero ya que los residuos de los

ácidos siálicos impiden la unión de los LOS a los anticuerpos presentes en el suero. En *N. gonorrea* se ha demostrado que la sialilación del lipopolisacárido (LPS) regula la entrada de la bacteria en la célula, así cuando el LPS contiene pocos residuos de Neu5Ac su transporte es muy eficiente pero se elimina fácilmente, sin embargo cuando el LPS está muy sialilado la bacteria entra con dificultad pero no es destruido por los anticuerpos (119).

Inzama *et al* (120) han demostrado que la sialilación de los LOS de *H. somnus* incrementa la resistencia de este patógeno a la acción bactericida de los anti-LOS del suero, por lo que la sialilación de los LOS puede considerarse un importante factor de virulencia para proteger a *H. somnus* contra el hospedador.

El LPS sialilado de *H. influenzae* es un factor de virulencia en esta bacteria y es interesante hacer notar que el microorganismo no sintetiza de novo ácidos siálicos sino que los secuestran del hospedador utilizando sus propias sialil-transferasas.

IMPORTANCIA BIOLÓGICA Y FISIOPATOLÓGICA DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS

La posición externa de los ácidos siálicos en glicoproteínas y gangliósidos, así como en membranas celulares externas tiene una gran importancia en biología celular. Así, estos monosacáridos acídicos pueden interactuar con los componentes de otras superficies celulares, sustancias extracelulares y efectores, lo que se evidencia por los múltiples eventos de reconocimiento celular en los que están implicados (73, 100, 121).

La presencia de ácidos siálicos en estructuras glicoproteicas les confieren naturaleza ácida y microheterogeneidad electroforética (122), aportándoles, además, una serie de propiedades específicas que en muchos casos les permiten actuar como receptores para micoplasmas (123, 124), lectinas vegetales y animales (125, 126), virus animales (125, 127), toxinas bacterianas (125, 128) e interferón (129). Asimismo, son responsables de la antigenicidad de determinados anticuerpos de grupos sanguíneos específicos (125), intervienen en interacciones célula a célula relacionadas con la diferenciación

celular y en el desarrollo organogénico (130, 131), participan en procesos de adhesión celular (132) y contribuyen a la alta viscosidad de las mucinas protectoras de endotelios (intestino, superficie de peces o huevos de rana entre otros).

Los gangliósidos son un grupo de glicoesfingolípidos que contienen en su molécula varios residuos glucídicos a los que se une uno o varios restos de ácidos siálicos en posición terminal. Por su localización en la capa externa de la membrana plasmática de las células de vertebrados, estos ácidos siálicos juegan un papel importante en la señal mediada por receptores (128) y en interacciones célula a célula (133, 134), y participan en la regulación del crecimiento celular y de algunos procesos celulares (135). En los tejidos neuronales se encuentran en concentraciones importantes (aproximadamente el 6% de los lípidos de la sustancia gris corresponden a este tipo de compuestos, siendo esta proporción diez veces superior a la existente en la sustancia blanca), estando involucrados, entre otros procesos, en la transmisión del impulso nervioso (136, 137, 138, 139).

Estas propiedades físico-químicas de los ácidos siálicos pueden ser moduladas por sustituyentes hidrofóbicos tales como grupos *O*-acetil u *O*-metil o por la hidroxilación de grupos *N*-acetil, aportando más propiedades hidrofílicas e incluso un lugar más lejano para el enlace glicosídico. La introducción de un grupo sulfato en los ácidos siálicos produce compuestos más ácidos. Estos ácidos siálicos con azufre se han encontrado en equinodermos (121). La carga negativa de los ácidos siálicos también contribuye al efecto anti-proteolítico de los mismos en glicoproteínas e inhibe la acción de algunas endoglicosidasas (4).

Todas estas funciones que desempeñan los ácidos siálicos pueden ser influenciadas por modificaciones químicas (Figura 6). Algunos ejemplos se citan a continuación:

a) La hidroxilación de Neu5Ac mejora la unión a algunos receptores, tales como CD22 humano y murino. En cambio, otros receptores como la sialoadhesina y la glicoproteína asociada a mielina (MAG) no toleran residuos *N*-glicolil (140). También es conocido que la hidroxilación favorece el ataque de algunos virus (141).

b) La *O*-acetilación favorece el ataque del virus influenza C y del virus de la hepatitis en ratón, a diferencia de la 9-*O*-acetilación

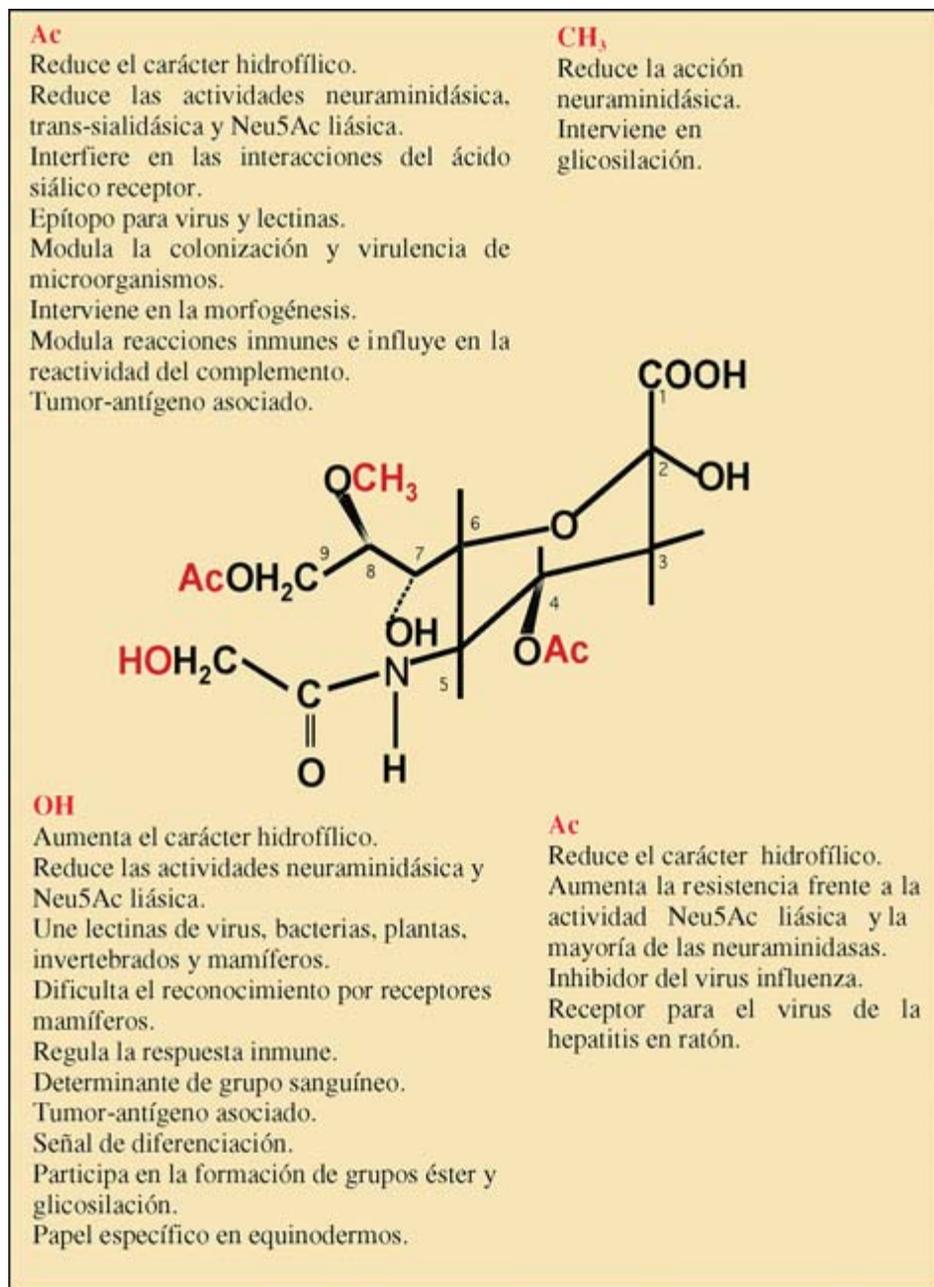


FIGURA 6. *Importancia biológica de los sustituyentes de los ácidos siálicos (48).*

que previene el ataque de los virus influenza A y B, así como los parásitos de la malaria (40).

c) La interacción receptor-ligando, implicada en la colonización de *Helicobacter pylori*, agente causante de enfermedades gástricas, puede ser inhibida por ligandos solubles, oligosacáridos sialilados y glicoproteínas como las presentes en la leche (142).

d) Es posible que una sialilación reversible junto con otras estructuras glicosiladas regule la adherencia celular y movilidad durante la embriogénesis y el crecimiento de células malignas (4, 143).

Se ha señalado la expresión de pequeñas cantidades de Neu5Gc, por ejemplo en gangliósidos presentes en tumores humanos (4). Sin embargo, en estos tejidos no se ha identificado actividad hidrosilasa por lo que se ha sugerido la posible procedencia de Neu5Gc de la dieta (141). Los gangliósidos, especialmente el GD3 con Neu5,9Ac₂ como azúcar terminal, han sido considerados antígenos asociados a tumores. Se ha observado un aumento en tumores de origen neuroectodermal (tumores de cerebro, mama o piel), pero también existe un aumento en tejido sano de crecimiento rápido (41).

Por todo ello, es obvio que los ácidos siálicos están implicados en múltiples procesos biológicos, presentando principalmente funciones estructurales y de protección, especialmente en las membranas celulares, y regulando las interacciones entre células y agentes infecciosos (48). En la Figura 6 se indica la función de los diferentes sustituyentes de la molécula de los ácidos siálicos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por MEC: AGL2006-01257 y por Junta de Castilla y León LE-039-06.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BLIX, G. (1936) Über die kohlenhydratgruppen des submaxillaris mucins. *Z. Physiol. Chem.* 240: 43-54.
- (2) KLENK, E. (1941) Neuraminsäure, das sapltproduct eines neuen gehirnlipoids. *Z. Physiol. Chem.* 268: 50-58.

- (3) WOOSE, C. R.; KANDLE, R. O. Y WHEELIS, M. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576-4579.
- (4) SCHAUER, R. Y KAMERLING, J. P. (1997) Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. En *Glycoproteins II*, vol. 11, pp 243-402 (Montreuil, J., Vliegthart, J. F G., Schachter, H. eds), Elsevier, Amsterdam.
- (5) WARREN, L. (1963) The distribution of sialic acid in nature. *Comp. Biochem. Physiol.* 10: 153-171.
- (6) FOUQUET, J. P. (1972) Free sialic acids in the seminal vesicle secretion of the golden hamster. *J. Reprod. Fertil.* 28: 273-275.
- (7) CORFIELD, A. P. Y SCHAUER, R. (1982) Occurrence of Sialic Acids. En *Sialic Acids, Chemistry, Metabolism and Function*, pp 37-39 (Schauer, R. ed.), Springer-Verlag Viena -New York.
- (8) MITSUOKA, C.; OHMORI, K.; KIMURA, N.; KANAMORI, A. Y KANNAGI, R. (1999) Regulation of selectin binding activity by cyclization of sialic acid moiety of carbohydrate ligands on human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 1597-1602.
- (9) ZANETTA, J. P.; PONS, A.; IWERSEN, M.; MARILLER, C.; TIMMERMAN, P. Y SCHAUER, R. (2001) Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. *Glycobiol.* 11: 663-676.
- (10) ROTH, J.; KEMPF, A.; REUTER, G.; SCHAUER, R. Y GEHRING, W. J. (1992) Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* 256: 673-675.
- (11) MALYKH, Y. N.; KRISCH, B.; GERARDY-SCHAHN, R.; LAPINA, E. B.; SHAW, L. Y SCHAUER, L. (1999) The presence of N-acetylneuramic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaenus spumarius*. *Glycoconj. J.* 16: 731-739.
- (12) ANGATA, T. Y VARKI, A. (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem. Rev.* 102: 439-469.
- (13) ZELENY, R.; KOLARICH, D.; STRASSER, R. Y ALTMANN, F. (2006) Sialic acid concentrations in plants are in the range of inadvertent contamination. *Planta*. 224: 222-227.
- (14) CORFIELD, A. P. Y SCHAUER, R. (1982) Metabolism of Sialic Acids. En *Sialic Acids, Chemistry, Metabolism and Function*, pp 37-39 (Schauer, R. ed.), Springer-Verlag Viena-New York.
- (15) BARRY, G. T. Y GOEBEL, W. F. (1957) Colominic acid a substance of bacterial origin related to sialic acid. *Nature*. 179: 206.
- (16) ANNUNZIATO, P. W.; WRIGHT, L. F.; VANN, W. F. Y SILVER, R. P. (1995) Nucleotide sequence and genetic analysis of the neuD and neuB genes in region 2 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. *J. Bacteriol. J.* 177: 321-319.
- (17) EDWARDS, U.; MULLER, A.; HAMMERSCHMIDT, S.; GERARDY-SCHAHN, R. Y FROSCH, M. (1994) Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8-polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Mol. Microbiol.* 14: 141-149.
- (18) LINTON, D.; KARLYSEV, A. V.; HITCHEN, P. G.; MORRIS, H. R.; DELL, A.; GREGSON, N. A. Y WREN, B. W. (2000) Multiple N-acetyl neuraminic synthetase (neuB)

- genes in *Campylobacter jejuni*: identification and characterization of the gene involved in sialylation of lipo-oligosaccharide. *Mol. Microbiol.* 35: 1120-1134.
- (19) PLUMBRIDGE, J. Y VIMR, E. (1999) Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 47-54.
- (20) FERNÁNDEZ V. (2007) Estudios Moleculares sobre la neuraminidasa de *Manheimia haemolytica* 2 Secretariado de Publicaciones ,Universidad de León , León, España
- (21) MASSON, L. Y HOLBEIN, B. E. (1983) Physiology of sialic acid capsular polysaccharide synthesis in serogroup B of *N. meningitidis*. *J. Bacteriol.* 54: 728-736.
- (22) ADLAM, C.; KNIGHTS, J. M.; MUGRIDGE, A.; WILLIAMS, J. M. Y LINDON, J. C. (1987) Production of colominic acid by *P. haemolytica* serotype A2 organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 42: 23-25.
- (23) DEVI, S. J.; SCHNEERSON, R.; EGAN, W.; VANN, W. F.; ROBBINS, J. B. Y SHILOACH, J. (1991) Identity between polysaccharide antigens of *Moraxella nonliquefaciens*, group B *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli* K1 (non-O acetylated). *Infect. Immun.* 59: 732-736.
- (24) TSVETKOV, Y. E.; SHASHKOV, A. S.; KNIREL, Y. A. Y ZHRINGER, U. (2001) Synthesis and identification in bacterial lipopolysaccharides of 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galacto- and -D-glycero-D-talo-non-2-ulonic acids. *Carbohydr. Res.* 12: 233-237.
- (25) GIL-SERRANO, A. M.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; TEJERO-MATEO, P.; ESPARTERO, J. L.; MENÉNDEZ, M.; CORZO, J.; RUIZ-SAINZ, J. E. Y BUENDÍA-CLAVERIA, A. M. (1999) Structural determination of a 5-acetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-7-(3-hydroxybutyramido)-L-glycero-L-manno-nonulosonic acid-containing homopolysaccharide isolated from *Sinorhizobium fredii* HH103. *Biochem. J.* 342: 527-535.
- (26) MULDOON, J.; SAHSHKOV, A. S.; SENCHENKOVA, S. N.; TOMSHICH, S. V.; ROMANDROVA, N. A.; KNIREL, Y. A. Y SAVAGE, A. V. (2001) Structure of an acidic polysaccharide from a marine bacterium *Pseudoaltromonas distincta* KMM 638 containing 5-acetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-7-formamido-L-glycero-L-manno-nonulosonic acid. *Carbohydr. Res.* 330: 231-239.
- (27) KNIREL, Y. A.; GROSSKURTH, H.; HELBIG, J. H. Y ZHRINGER, U. (1995) Structures of decasaccharide and tridecasaccharide tetraphosphates isolated by strong alkaline degradation of O-deacylated lipopolysaccharide of *Pseudomonas fluorescens* strain ATCC 49271. *Carbohydr. Res.* 279: 215-226.
- (28) HUNT, L. A. Y SUMMERS, D. F. (1976) Glycosilation of vesicular stomatis virus proteins with Hela cell membranes and released virus. *J. Virol.* 20: 646-657.
- (29) SHIRAIISHI, H.; KOHOMA, T.; SHIPAIISHI, R. Y ISHIDA, N. (1977) Carbohydrate composition of hepatitis B surface antigen. *J. Gen. Virol.* 36: 207-210.
- (30) LENARD, J. Y COMANS, R. W. (1974) The membrane structure of lipid-containing viruses. *Biochim. Biophys. Acta.* 344: 51-94.
- (31) BRAVO, I. G. Y REGLERO, A. (2003) The cytidilyltransferases family: Properties, kinetics, genomic and phylogeny. *Recent. Res. Devel. Biochem.* 4: 223-254.
- (32) BRAVO, I. G.; GARCÍA-VALLVÉ, S.; ROMEO, A. Y REGLERO, A. (2004) Prokaryotic origin of cytidilyltransferases and α -ketoacid synthases. *Trends in Microbiol.* 12: 120-128.

- (33) VARKI, A. (1992) Diversity in the sialic acids. *Glycobiol.* 2: 25-40.
- (34) TRAVING, C. Y SCHAUER, R. (1998) Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 1330-1349.
- (35) TANNER, M. E. (2005) The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Biorg. Chem.* 33: 216-228.
- (36) TERADA, T.; KITAZUME, S.; KITAJIMA, K.; INOUE, S.; ITO, F.; TROY, F. A. E INOUE, Y. (1993) Synthesis of CMP-deaminoneuraminic acid (CMP-KDN) using the CTP: CMP-3-deoxynonulosonate cytidylyltransferase from rainbow trout testis. Identification and characterization of a CMP-KDN synthetase. *J. Biol. Chem.* 268: 2640-2648.
- (37) ANGATA, T.; NAKATA, D.; MATSUDA, T.; KITAJIMA, K. Y TROY, F. A. II (1999) Bio-synthesis of KDN (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid). Identification and characterization of a KDN-9-phosphate synthetase activity from trout testis. *J. Biol. Chem.* 274: 22949-22956.
- (38) HARDUIN-LEPERS, A.; STOKES, D. C.; STEELANT, W. F.; SAMYN-PETIT, B.; KRZEWINSKI-RECCHI, M. A.; VALLEJO-RUIZ, V.; ZANETTA, J. P.; AUGE, C. Y DELANNOY, P. (2001) Cloning, expression and gene organization of a human Neu5Ac alpha 2-3Gal beta 1-3GalNAc alpha 2,6-sialyltransferase: hST6GalNAcIV. *Biochem. J.* 352: 37-48.
- (39) ACHYUTHAN, K. E. Y ACHYUTHAN, A. M. (2001) Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo- α -sialidases (neuraminidases). *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 129: 29-64.
- (40) SCHAUER, R.; REUTER, G. Y STOLL, S. (1988) Sialate O-acetylerases: key enzymes in sialic acid catabolism. *Biochimie.* 70: 1511-1519.
- (41) SCHAUER, R.; SCHMID, H.; POMMERENCKE, J.; IWERSEN, M. Y KOHLA, G. (2001) Metabolism and role of O-acetylated sialic acids. En Molecular Immunology of Complex Carbohydrates 2, Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 491, pp 325-342 (Wu, A. M. ed.), Kluwer Academics, Plenum Publishers, New York.
- (42) TAUBER, R.; REUTTER, W. Y GEROK, W. (1987) Role of membrane glycoproteins in mediating trophic reponses. *Gut.* 28: 71-77.
- (43) TAUBER, R.; PARK, C. S.; BECKER, R.; GEYER, R. Y REUTTER, W. (1989) Rapid intramolecular turnover of N-linked glycans in plasma membrane glycoproteins. Extension of intramolecular turnover to the core sugars in plasma membrane glycoproteins of hepatoma. *Eur. J. Biochem.* 186: 55-62.
- (44) KREISEL, W.; HILDEBRANDT, H.; MOSSNER, W.; TAUBER, R. Y REUTTER, W. (1993) Oligosaccharide reprocessing and recycling of a cell surface glycoprotein in cultured rat hepatocytes. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 374: 255-263.
- (45) SCHAUER, R.; SOMMER, U.; BECKER, H.; VAN UNEN, H. Y TRAVING, C. (1999) The terminal enzymes of sialic acid metabolism: acylneuraminase pyruvate-lyases. *Biosci. Rep.* 19: 373-83.
- (46) SCHAUER, R.; REUTER, G.; MUHLPFORDT, H.; ANDRADE, A. F. Y PEREIRA, M. E. (1983) The occurrence of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 364: 1053-1057.
- (47) ENGSTLER, M.; SCHAUER, R. Y BRUN, R. (1995) Distribution of developmentally regulated trans-sialidases in the Kinetoplastida and characterization of a

- shed trans-sialidase activity from procyclic *Trypanosoma congolense*. *Acta Trop.* 59: 117-29.
- (48) SCHAUER, R. (2000) Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj. J.* 17: 489-499.
- (49) ZAPATA, G.; CROWLEY, J. M. Y VANN, W. F. (1992) Sequence and expression of the *Escherichia coli* NeuC gene product. *J. Bacteriol.* 174: 315-319.
- (50) PETERSEN, M.; FESSNER, W.; FROSCH, M. Y LUNEBERG, E. (2000) The siaA gene involved in capsule polysaccharide biosynthesis of *Neisseria meningitidis* B codes for N-acetylglucosamine-6-phosphate 2-epimerase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 184: 161-164.
- (51) DAINES, D. A.; WRIGHT, L. F.; CHAFFIN, D. O.; RUBENS, C. E. Y SILVER, R. P. (2000) NeuD plays a role in the synthesis of sialic acid in *Escherichia coli* K1. *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 281-284.
- (52) SWARTLEY, J. S. Y STEPHENS, D. S. (1994) Identification of a genetic locus involved in the biosynthesis of N-acetyl-D-mannosamine, a precursor of the (alpha 2?8)-linked polysialic acid capsule of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 176: 1530-1534.
- (53) RODRIGUEZ-APARICIO, L. B.; FERRERO, M. A. Y REGLERO, A. (1995) N-acetyl-D-neuraminic acid synthesis in *Escherichia coli* K1 occurs through condensation of N-acetyl-D-mannosamine and pyruvate. *Biochem. J.* 308: 501-505.
- (54) FERRERO, M. A.; REGLERO, A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; ORDÁS, R. Y RODRIGUEZ-APARICIO, L. B. (1996) N-acetyl-D-neuraminic acid lyase generates the sialic acid for colominic acid biosynthesis in *Escherichia coli* K1. *Biochem. J.* 317: 157-165.
- (55) BROSSMER, R.; ROSE, U.; KASPAR, D.; SMITH, T. L.; GRASMUK, H. Y UNGER, F. M. (1980) Enzymic synthesis of 5-acetamido-9-azido-3,5,9-trideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid, a 9-azido-9-deoxy derivative of N-acetylneuraminic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 1282-1289.
- (56) REGLERO, A.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, V.; GUTIÉRREZ, C. Y BRAVO, I. G. (2005) N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in bacteria: occurrence, metabolism and associated virulence. *Current Topic in Biochem. Research.* 7: 17-28.
- (57) VIMR, E. R. Y LICHTENSTEIGER, C. (2002) To sialylate, or not sialylate: that is the question. *Trends in Microbiol.* 10: 254-257.
- (58) POPENOE, E.A. Y DREW, R.M. (1957) The action of an enzyme of *Clostridium perfringens* on orosomuroid. *J. Biol. Chem.* 228: 673-683
- (59) BRUG, J.; ESSER, R.J. Y PAERELS, G.B. (1959) The enzymic cleavage of N-acetylneuraminic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 33: 241-242.
- (60) UCHIDA, Y.; TSUKADA, Y. Y SUGIMORI, T. (1984) Purification and properties of N-acetylneuraminic lyase from . *J. Biochem.* 96: 507-522.
- (61) DEIJL, C.M. Y VLIEGENTHART, J.F. (1983) Configuration of substrate and products of N-acetylneuraminic pyruvate-lyase from *Clostridium perfringens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 668-674
- (62) LILLEY, G.G.; BARBOSA, J.A.R.G., AND PEARCE, L.A. (1998) Expression in *Escherichia coli* of the putative N-acetylneuraminic lyase gene (nanA) from *Haemophilus influenzae*: overproduction, purification, and crystallization. *Protein Expression and Purification.* 12: 295-304.

- (63) IZARD, T.; LAWRENCE, M. C.; MALBY, R. L.; LILLEY, G. AND COLMAN, P. M. (1994) The three-dimensional structure of N-acetylneuraminidase from *Escherichia coli*. *Structure*. 2: 361-369.
- (64) VIMR, E. R., and TROY, F. A., (1985) Identification of an inducible catabolic system for sialic acids (nan) in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 164: 845-853.
- (65) MURAKAMI, M.; IKEDA, K. Y ACHIWA, K. (1996) Chemoenzymatic synthesis of neuraminic acid analogs structurally varied at C-5 and C-9 as potential inhibitors of the sialidase from influenza virus. *Carbohydr Res.* 280: 101-110.
- (66) HIRST, G.K. (1941) The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science.* 94: 22-23.
- (67) BURNET, F. M.; MCCREA, J. F. Y STONE, J. D. (1946) Modification of human red cells by virus action. I. The receptor gradient for virus action in human red cells. *Br. J. Exp. Pathol.* 27: 228-236.
- (68) HEIMER, P. Y MEYER, K. (1956) Studies on sialic acid of submaxillary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42: 728-734.
- (69) GOTTSCHALK, A. (1957) Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. *Biochem. Biophys. Acta.* 23: 645-646.
- (70) ROSENBERG, A. Y SCHENGRUND, C. L. (1976) Biological Roles of Sialic Acid. Plenum Press, New York-London.
- (71) CABEZAS, J. A.; REGLERO, A. Y CALVO, P. (1983) Glycosidases (fucosidases, galactosidases, glucosidases, hexoaminidases and glucuronidase from some molluscs and vertebrates, and neuraminidase from virus). *Int. J. Biochem.* 15: 243-259.
- (72) CABEZAS, J. A. (1991) Some questions and suggestions on the type references of the official nomenclature (IUB) for sialidase(s) and endosialidase. *Biochem. J.* 278: 311-312.
- (73) VIMR, E. R. (1994) Microbial sialidases. Does bigger always mean better? *Trend Microbiol.* 2: 271-277.
- (74) CORFIELD, A. P. (1992) Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiol.* 2: 509-521.
- (75) IFEANYI, F. G. Y BAILIE, W. E. (1992) Passive protection of mice with anti-serum to neuraminidase from *Pasteurella multocida* serotype A:3. *Vet. Res. Commun.* 16: 97-105.
- (76) STRAUS, D. C.; JOLLEY, W. L. Y PURDY, C. W. (1996) Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 64: 1446-1449.
- (77) LICHTENSTEIGER, C. A. Y VIMR, E. R. (1997) Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152: 269-274.
- (78) ROGGENTIN, P.; KLEINEIDAM, R. Y SCHAUER, R. (1995) Diversity in the properties of two sialidase isoenzymes produced by *Clostridium perfringens*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 376: 569-575.
- (79) ROGGENTIN, P.; ROTHE, B.; KAPER, J. B.; GALEN, J.; LAWRISSUD, L., VIMR, E. R. Y SCHAUER, R. (1989) Conserved sequences in bacterial and viral sialidases. *Glycoconj. J.* 6: 349-353.
- (80) CRENNELL, S. J.; GARMAN, E. F.; LAVER, W. G., VIMR, E. R. Y TAYLOR, G. L. (1993) Crystal structure of a bacterial sialidase (from *Salmonella typhimurium*).

- rium* LT2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9852-9856.
- (81) CRENNELL, S. J.; GARMAN, E. F.; LAVER, W. G.; VIMR, E. R. Y TAYLOR, G. L. (1994) Crystal structure of a *Vibrio cholerae* sialidase reveals dual lectin-like domains in addition to the catalytic domain. *Structure.* 2: 535-544.
- (82) GASKELL, A.; KENNE, S. J. Y TAYLOR, G. L. (1995) The three domains of a bacterial sialidase: a β -propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll. *Structure.* 3: 1197-1205.
- (83) DRZENIEK, R. (1972) Viral and bacterial neuraminidases, *Topics Microbiol. Immunol.* 59: 35-74
- (84) GOTTSCHALK, A. Y DRZENIEK, R. (1972) Neuraminidase as tool for structural analysis. En *Glycoproteins: their composition, structure, and function*, vol 5A, pp 381-402 (Gottschalk, A. ed.), Elsevier, North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- (85) CORFIELD, A. P.; VEH, R. W.; WEMBER, M.; MICHALSKI, J. C. Y SCHAUER, R. (1981) The release of N-acetyl- and N-glycolyl-neuraminic acid from soluble complex carbohydrates and erythrocytes by bacterial, viral and mammalian sialidases. *Biochem. J.* 197: 293-299.
- (86) GOTTSCHALK, A. (1958) Neuraminidase; its substrate and mode of action. *Adv. Enzymol.* 20: 135-146.
- (87) AMINOFF, D. (1961) Methods for quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.* 81: 384-391.
- (88) MCGUIRE, E. J. Y BLINKEY, S. E. (1964) The structure and chemistry of colominic acid. *Biochemistry* 3: 247-251.
- (89) BROSSMER, R. Y HOLMQUIST, L. (1971) On the specificity of neuraminidase. Synthesis of 5-N-acetyl-D-nonulosamine (5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonamide) and their methyl and benzyl-ketosides. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 352: 1715-1719.
- (90) BROSSMER, R. Y NEBELIN, E. (1969) Synthesis of N-formyl and N-succinyl-D-neuraminic acid on the specificity of neuraminidase. *FEBS Lett.* 4: 335-336.
- (91) FAILLARD, H.; FERREIRA DO AMARAL, C. Y BLOHM, M. (1969) Studies on the enzymatic specificity of neuraminidase and N-acyl-neuraminatelyase in relation to N-substitution. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350. 798-802.
- (92) SCHAUER, R. Y FAILLARD, H. (1968) Action specificity of neuraminidase. The action of bacterial neuraminidase on isomeric N,O-diacetylneuraminic acid glycosides in the submaxillary mucin of horse and cow. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 349: 961-968.
- (93) SUTTAJIT, M. Y WINZLER, R. (1971) Effect of modification of N-acetylneuraminic acid on the binding of glycoproteins to influenza virus and on susceptibility to cleavage by neuraminidase. *J. Biol. Chem.* 246. 3389-3404.
- (94) VEH, R. W.; CORFIELD, A. P.; SANDER, M. Y SCHAUER, R. (1976) Neuraminic acid-specific modification and tritium labelling of gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* 486: 145-160.
- (95) BROSSMER, R.; KEILICH, G. Y ZIEGLER, D. (1977) Inhibition studies on *Vibrio cholerae* neuraminidase. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 358: 391-396.

- (96) DRZENIEK, R. (1973) Substrate specificity of neuraminidases. *Histochem. J.* 5: 271-290.
- (97) UCHIDA, Y.; TSUKADA, Y. Y SUGIMORI, T. (1979) Enzymatic properties of neuraminidases from *Arthrobacter urefaciens*. *J. Biochem.* 86: 1573-1585.
- (98) SAITO, M.; SUGANO, K. Y NAGAI, Y. (1979) Action of *Arthrobacter ureafaciens* sialidase on sialoglycolipid substrates. Mode of action and highly specific recognition of the oligosaccharide moiety of ganglioside GM1. *J. Biol. Chem.* 254: 7845-7854.
- (99) VIMR, E. R.; KALIVODA, A. K.; DSEZO, L. E. Y STEENBERGEN, M. S. (2004) Diversity of Microbial Acid Metabolism. *Microbiol. Mol. Biol.* 68; 132-153.
- (100) REGLERO, A.; APARICIO-RODRIGUEZ, L. B. Y LUENGO, J. M. (1993) Polysialic acids. *Int. J. Biochem.* 11: 1517-1527.
- (101) WHITFIELD, C. (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 39-68.
- (102) PARSONS, N. J.; PATEL, V.; TAN, E. L.; ANDRADE, J. R.; NAIRN, C. A.; GOLDNER, M.; COLE, J. A. Y SMITH, H. (1988) Cytidine 5'-monophospho-N-acetyl neuraminic acid and a low molecular weight factor from human blood cells induce lipopolysaccharide alteration in gonococci when conferring resistance to killing by human serum. *Microl. Patol.* 5. 303-309.
- (103) ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Y SCHAUER, R. (1999) Sialic acids in fungi: a minireview. *Glycoconj. J.* 16: 545-554.
- (104) BUSCHIAZZO, A.; TAVARES, G. A.; CAMPETELLA, O.; SPINELLI, S.; CREMONA, M. L.; PARIS, G.; AMAYA, M. F.; FRASCH, C. C. Y ALZARI, P. M. (2000) Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases. *EMBO J.* 19: 16-24.
- (105) SHELL, D. M.; CHILES, L.; JUDD, R. C.; SEAL, S. Y REST, R. F. (2002) The *Neisseria* lipooligosaccharide-specific alpha-2, 3-sialyltransferase is a surface-exposed outer membrane protein. *Infect. Immun.* 70: 3744-3751.
- (106) PREVIATO, J. O.; ANDADE, A. F. Y PESSOLANI, M. C. (1985) Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 85-96.
- (107) TIRALONGO, E.; SCHRADER, S., LANGE, H.; LEMKE, H.; TIRALONGO, J. Y SCHAUER R. (2003) Two trans-sialidase forms with different sialic acid transfer and sialidase activities from *Trypanosoma congolense*. *J. Biol. Chem.* 278: 23301-23310.
- (108) MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. Y ANDRADE, A. F. B. (1998) Trans-sialidase activity for sialic acid incorporation on *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiol Lett.* 168: 167-172.
- (109) FULLER, T. E.; KENNEDY, M. J. Y LOWERY, D. E. (2000) Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemias mouse using signature-tagged mutagenesis. *Microb. Pathog.* 29: 25-38.
- (110) VIMR, E. R.; LICHTENSTEIGER, C. Y STEENBERGEN, S. (2000) Sialic acid metabolism's dual function in *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* 36: 1113-1123.
- (111) RINGENBERG, M.; LICHTENSTEIGER, C. A. Y VIMR, E. R. (2001) Redirection of sialic acid metabolism in genetically engineered *Escherichia coli*. *Glycobiol.* 11: 533-539.

- (112) SCHILLING, B.; GOON, S.; SAMUELS, N. M.; GAUCHER, S. P.; LEARY, J. A.; BERTOZZI, C. R. Y GIBSON, B. W. (2001) Biosynthesis of sialylated lipooligosaccharides in *Haemophilus ducreyi* is dependent on exogenous sialic acid and not mannosamine. Incorporation studies using N-acylmannosamine analogues, N-glycolylneuraminic acid, and ¹³C-labeled N-acetylneuraminic acid. *Biochemistry*. 40: 12666-12677.
- (113) TSAI, C. M. (2001) Molecular mimicry of host structures by lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*: characterization of sialylated and nonsialylated lacto-N-neotetraose (Galbeta1-4GlcNAc beta1-3Galbeta1-4Glc) structures in lipooligosaccharides using monoclonal antibodies and specific lectins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 491: 525-442.
- (114) GILBERT, M.; BRISSON, J.-R.; KARWASKI, M.-F.; MICHNIEWICZ, J.; CUNNINGHAM, A.-M.; WU, Y.; YOUNG, N.M. AND WAKARCHUK, W.W. (2000) Biosynthesis of ganglioside mimics in *Campylobacter jejuni* OH4384. Identification of the glycosyltransferase genes, enzymatic synthesis of model compounds, and characterization of nanomole amounts by 600-mhz (1)h and (13)c NMR analysis. *J Biol Chem*. 275: 3896-3906.
- (115) MORAN, A.P.; PRENDERGAST, M.M. AND APPELMELK, B.J. (1996) Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16: 105-115.
- (116) MANDRELL, R.E.; MCLAUGHLIN, R.; KWAIK, Y.A.; LESSE, A.; YAMASAKI, R.; GIBSON, B.; SPINOLA, S.M. AND APICELLA, M.A. (1992) Lipooligosaccharides (LOS) of some *Haemophilus* species mimic human glycosphingolipids, and some LOS are sialylated. *Infect. Immun.* 60: 1322-1328.
- (117) YUKI, N.; TAKI, T.; INAGAKI, F.; KASAMA, T.; TAKAHASI, M.; SAITO, K.; HANDA, S. Y MIYAKAT, T. (1993) A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillian-barré syndrome has a G_{M1} ganglioside-linde structure. *J. Exp. Med.* 178: 1771-1775.
- (118) WETZLER, L.M.; BARRY, K.; BLAKE, M.S. AND GOTSCHLICH, E.C. (1992) Gonococcal lipooligosaccharide sialylation prevents complement-dependent killing by immune sera. *Infect. Immun.* 60: 39-43.
- (119) VAN PUTTEN, J.P.M. (1993) Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae*. *EMBO J.* 12: 4043-4051.
- (120) INZANA, T.J.; GLINDEMANN G.; COX, A.D.; WAKARCHUK, W. Y HOWARD, M.D. (2002) Incorporation of N-acetylneuraminic acid into *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide (LOS): enhancement of resistance to serum and reduction of LOS antibody binding. *Infect. Immun.* 70: 4870-4879.
- (121) SCHAUER, R. (2004) Victor Ginsburg's influence on my research of the role of sialic acids in biological recognition. *Arch. Biochem. Biophys.* 426: 132-141.
- (122) GOTTSCHALK, A. (1969) Biosynthesis of glycoproteins and its relationship to heterogeneity. *Nature*. 222: 452-454.
- (123) RAZIN, S.; KAHANE, I.; BANAI, M. Y BREDT, W. (1981) Adhesions of mycoplasmas to eukaryotic cells. *Ciba Found Symp.* 80: 98-118.
- (124) LOOMES, L. M.; UEMURA, K.; CHILDS, R. A.; PAULSON, J. C.; HOUNSELL, E. F.; TAYLOR-ROBINSON, D. Y FEIZI, T. (1984) Erythrocyte receptors for *Mycoplasma*

- pneumoniae* are sialylated oligosaccharides of I antigen type. *Nature*. 307: 5951-5963.
- (125) SCHAUER, R. (1982) Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40: 131-234.
- (126) IMBERTY, A.; GAUTIER, C.; LESCAR, J.; PEREZ, S.; WYNS, L. Y LORIS, R. (2000) An unusual carbohydrate oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 23: 17541-17548.
- (127) HARDUIN-LEPERS, A.; RECCHI, M. A. Y DELANNOY, P. (1995) «1994, The year of sialyltransferases». *Glycobiol.* 5: 741-758.
- (128) EMSLE, P.; FOTINOU, C.; BLACK, I.; FAIRWEATHER, N. F.; CHARLES, I. G.; WATTS, C., HEITT, E. Y ISAACS, N. W. (2000) The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J. Biol. Chem.* 12: 8889-8894.
- (129) ANKEL, H.; KRISHNAMURTI, C.; BESANCON, F.; STEFANOS, S. Y FALCOFF, E. (1980) Mouse fibroblast (type I) and immune (type II) interferons: pronounced differences in affinity for gangliosides and antiviral and antigrowth effects on mouse leukemia L-1210R cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2528-2532.
- (130) LACKIE, P. M.; ZUBER, C. Y ROTH, J. (1994) Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives. *Differentiation*. 57: 119-131.
- (131) MURAKAMI, S.; SEKI, T.; RUTISHAUSER, U. Y ARAI, Y. (2000) Enzymatic removal of polysialic acid from neural cell adhesion molecule perturbs the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing chick forebrain. *J. Comp. Neurol.* 420: 171-181.
- (132) SCHEMELL, E.; SLIFE, C. W.; KUHLENSCHMID, M. S. Y ROSEMAN, S. (1982) Studies on the intracellular adhesion of rat and chicken hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 257: 2171-3176.
- (133) HAKOMORI, S. (1983) Tumor-associated glycolipid antigens defined by monoclonal antibodies. *Bull. Cancer* 70: 118-126.
- (134) PAN, X. L.; IZUMI, T.; YAMADA, H.; AKIYOSHI, K.; SUENOBU, S. Y YOKOYAMA, S. (2000) Ganglioside patterns in neuroepithelial tumors of childhood. *Brain Dev.* 22: 196-198.
- (135) CABEZAS, J. A. Y CALVO, P. (1984) Gangliósidos. *Investigación y Ciencia*. 94: 86-95.
- (136) WIEGANDT, H. (1982) The gangliosides. *Adv. Neurochem.* 4: 149-223.
- (137) RAHMANN, H. (1995) Brain gangliosides and memory formation. *Behav. Brain Res.* 66: 105-116.
- (138) MURASE, S. Y SCHUMAN, E. M. (1999) The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 549-553.
- (139) BENSON, D. L.; SCHNAPP, L.; SHAPIRRO, L. Y HUNTLEY, G. W. (2000) Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends in Cell Biol.* 10: 473-482.
- (140) KELM, S.; BROSSMER, R.; ISECKE, R.; GROÂ, H. J.; STRENGE, K. Y SCHAUER, R. (1998) Functional groups of sialic acids involved in binding to siglecs (sialoadhesins) deduced from interactions with synthetic analogues. *Eur. J. Biochem.* 255: 663-672.

- (141) SCHAUER, R.; MALYKH, Y. N.; KRISCH, B.; GOLLUB, M. Y SHAW, L. (1999) Biosynthesis and biology of N-glycolilneuraminic acid. En *Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosilation*, pp 17-27 (Inoue, Y., Lee, Y. C. y Troy, F. A. II eds.), Gakushin Publishing Co., Osaka. Japón.
- (142) HIRMO, S.; KELM, S.; IWERSEN, M.; HOTTA, K.; GOSO, Y.; ISHIRA, K.; SUGURI, T.; MORITA, M.; WADSTRÖM, T. Y SCHAUER, R. (1998) Inhibition of *Helicobacter pylori* sialic acid-specific haemagglutination by human gastrointestinal mucins and milk glycoproteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20: 275-281.
- (143) KELM, S. Y SCHAUER, R. (1997) Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytol.* 175: 137-240.