

MUCOPOLISACARIDOS ACIDOS EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATON ALBINO SUIZO. ANALISIS BIOQUIMICO

Graciela Luengo de Narváez*, Haydée V. de Castejón** y Elena Ryder**

RESUMEN

Se determinó la concentración de ácidos urónicos en diferentes fracciones obtenidas según el procedimiento de Schiller y colaboradores, a partir de cerebros de ratón albino suizo, adultos normales.

Se encontró que las fracciones I (ácido hialurónico) y II (condroitin-4-sulfato; 6-sulfato y dermatan sulfato) representan el 86,3% del total de los ácidos urónicos correspondiéndole a la fracción III (heparina), un 13,7%. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de las fracciones I y II, aunque se nota un ligero predominio de la fracción II.

INTRODUCCION

Los mucopolisacáridos ácidos (M P A) son macromoléculas formadas por una larga cadena no ramificada, cuyo esqueleto está constituido por unidades alternadas de ácidos urónicos y una hexosamina, unidos entre sí por enlaces glicosídicos. Pertenecen al grupo de los heteropolisacáridos, por poseer diferentes tipos de unidades monoméricas. Estos compuestos se encuentran normalmente formando polianiones, debido a la presencia de los ácidos urónicos, y en algunos casos, de grupos sulfatados.

Los principales mucopolisacáridos ácidos son: el ácido hialurónico, condroitin sulfato A, B y C, heparina y queratan sulfato, cuyos constituyentes, tipos de enlaces y estructura, se encuentran especificados en la tabla I y en la figura 1.

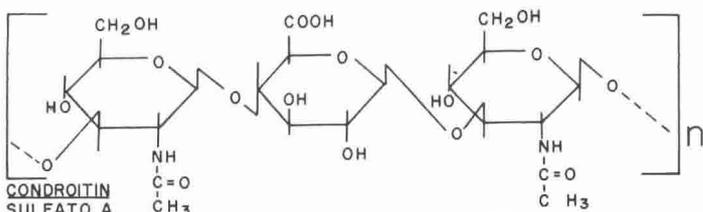
* Departamento de Biología y Química, Facultad de Humanidades y Educación, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

** Instituto de Investigación Clínica, Apartado 1151. Maracaibo, Venezuela.

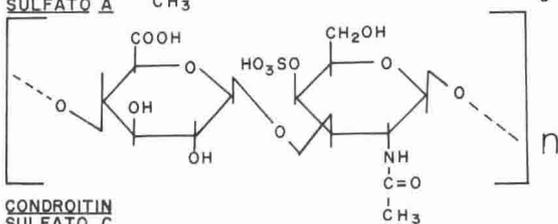
TABLA I
PRINCIPALES MUCOPOLISACARIDOS ACIDOS

NOMBRE	UNIDADES ESTRUCTURALES	
Acido hialurónico	Acido D-glucurónico 2- acetamida. 2-deóxi-D-glucosa	Beta, 1-3 Beta, 1-4
Condroitinsulfato A	Acido D-glucurónico 2 acetamida. 2 desoxi-D-galactosa 4 sulfato	Beta, 1-3 Beta, 1-4
Condroitinsulfato C	Acido D-glucurónico 2 acetamida. 2 desoxi-D-galactosa 6 sulfato	Beta, 1-3 Beta, 1-4
Condroitinsulfato B (Dermatan sulfato)	Acido L-iodurónico 2 acetamida. 2 desoxi-D-galactosa 4-sulfato	Alfa, 1-3 Beta, 1-4
Queratan-sulfato	D-galactosa 2 acetamida. 2 desoxi-D-glucosa 6-sulfato	Beta, 1-4 Beta, 1-3
Heparina	Acido D-glucurónico 2 glucosamina 2,6 disulfato	Alfa, 1-4 Alfa, 1-4

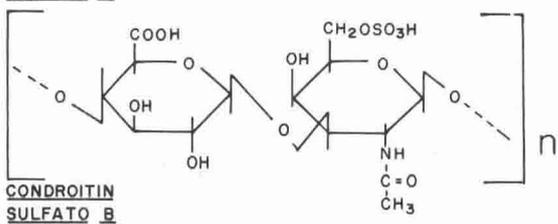
ACIDO HIALURONICO



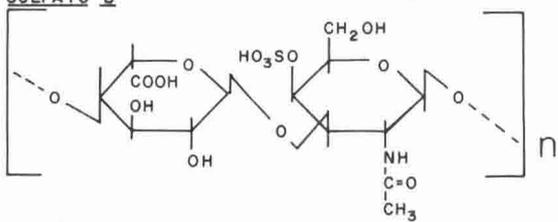
CONDROITIN SULFATO A



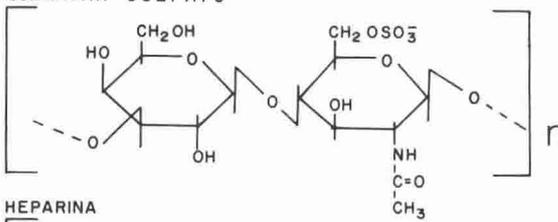
CONDROITIN SULFATO C



CONDROITIN SULFATO B



QUERATAN SULFATO



HEPARINA

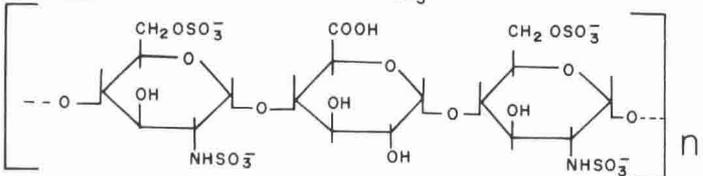


FIG. 1

Se encuentran ampliamente distribuídos en tejidos animales y en las bacterias, cumpliendo diversas funciones.

El ácido hialurónico se encuentra presente en variadas concentraciones en diferentes tejidos; en mamíferos se le encuentra en el cordón umbilical, piel y líquido sinovial, formando complejos salinos con muchas proteínas que puedan ser precipitadas a pH ácido.

El condroitinsulfato es uno de los principales constituyentes del cartílago, donde se encuentra unido a proteínas formando sales a expensas de los grupos sulfato y carboxilo del polisacárido y de los grupos básicos de las proteínas. Con el ácido hialurónico y el colágeno, es responsable de la fuerza tensora y elasticidad del tejido conectivo.

La heparina tiene marcada acción anticoagulante y se encuentra en la sangre y tejidos animales, generalmente formando glicoproteínas y lipopolisacáridos.

El queratan sulfato se encuentra principalmente en la córnea de bovinos, cartílago y tejido conectivo.

En el sistema nervioso central, las primeras investigaciones sobre la presencia de mucopolisacáridos ácidos fueron realizadas por Abood y Abul-Haj (1) y por Young y Abood (18), quienes con el empleo de técnicas histoquímicas, demostraron la presencia de ácido hialurónico en el axoplasma y neurilema de nervios periféricos de anfibios y mamíferos, y en citoplasma, axón y dendritas de las neuronas de cerebros de diferentes vertebrados.

A partir de 1958, diferentes investigadores (2, 7, 18), han llevado a efecto análisis bioquímicos en cerebro de distintos mamíferos, demostrando la existencia de diferentes mucopolisacáridos que corresponden al ácido hialurónico, condroitinsulfato A y C, heparan, heparan sulfato, dermatan sulfato y otros compuestos sulfatados que no han sido identificados.

Margolis (12) realizó un estudio bioquímico en cerebro de bovino, reportando solamente la presencia de ácido hialurónico y condroitinsulfato A y C. Este trabajo fue realizado en cerebro total y en la sustancia blanca.

Onodera y colaboradores (13), reportaron un estudio bioquímico comparativo en mono, conejo y bovino, concluyendo que el contenido de estos compuestos varía de una especie a otra.

Kuriyama y Roberts (11), practicando fraccionamiento subcelular en cerebro de ratón, han demostrado que las concentraciones de condroitinsulfato predominan sobre las concentraciones de ácido hialurónico y de otros mucopolisacáridos ácidos no identificados, y Castejón HV, en trabajos histoquímicos realizados tanto en ratón (3, 4, 5), como en otros vertebrados (6), ha demostrado que el citoplasma neuronal del sistema nervioso central contiene ácido hialurónico y condroitinsulfato A ó C y en la periferia celular aparece un compuesto sulfatado digerible por la hialuronidasa testicular. El papel que desempeñarían estas macromoléculas en las funciones del sistema nervioso central está siendo muy discutido, citándose funciones como la conducción del impulso nervioso, la excitabilidad y la mielogénesis (9, 15, 16, 17).

Tomando en consideración los resultados y conclusiones de los trabajos anteriores, se consideró conveniente realizar el estudio bioquímico del cerebro de un roedor muy utilizado en los laboratorios de investigación, como lo es el ratón albino suizo, con el fin de determinar la concentración de los diferentes mucopolisacáridos ácidos y obtener un patrón en el adulto normal que nos permita luego estudiar las variaciones en algunos procesos fisiológicos y patológicos.

MATERIAL Y METODO

Fueron utilizados 60 ratones albinos suizos, adultos normales, cuyo peso variaba entre 25 y 30 grs. reunidos en grupos de 10.

Los animales fueron sacrificados por decapitación sin anestesia, los cerebros fueron extraídos cuidadosamente, pesados, eliminada la pía madre bajo la lupa estereoscópica y lavados con buffer fosfato 0,2 M frío.

El tejido cerebral se homogeneizó en cinco volúmenes K_2HPO_4 0,2M, y se sometió a digestión con tripsina utilizando 10 mgs por gramo de tejido, por un tiempo de 72 horas a 37°C, según la técnica de Schiller, Slover y Dorfman (14). Las proteínas fueron luego precipitadas con ácido tricloroacético a una concentración final del 10% y centrifugadas a 1.500 rpm. El precipitado fue desechado y el sobrenadante fue dializado contra agua destilada por 24 horas a 0°C.

Precipitación y separación de los Mucopolisacáridos Ácidos.

Los MPA fueron precipitados del sobrenadante previamente dializado, con bromuro de acetil piridina (BAP), utilizando una concentración final del 10%, seguido por una incubación a 37°C por una hora. Esta mezcla fue centrifugada a 2.700 rpm. por 30 minutos, descartando el sobrenadante.

De esta manera se obtiene un precipitado que contiene los MPA totales del tejido cerebral. Este precipitado es lavado con solución de ClNa 0,03 M en bromuro de acetil piridina al 0,1% y centrifugado por 20 minutos.

Para separar los diferentes MPA contenidos en el precipitado, éste es sometido a lavados con 5 ml de ClNa a concentraciones crecientes, seguidas por centrifugaciones a 3.000 rpm por 20 minutos cada una.

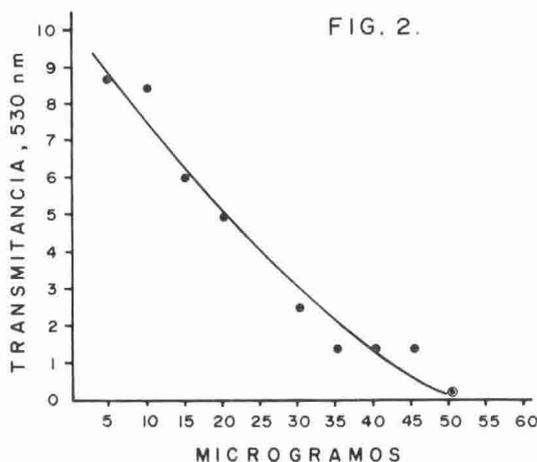
La fracción I fue separada por 4 extracciones con ClNa 0,4 M. La fracción II se separó del precipitado total mediante tres extracciones con ClNa 1,2 M y la fracción III se obtuvo luego de realizarse dos lavados con solución 2,1 M de ClNa. Este procedimiento es el descrito por Schiller y colaboradores (14).

A cada fracción resultante de los lavados se le determinó el contenido de los ácidos urónicos.

Determinación de los ácidos urónicos.

Fue seleccionado el procedimiento colorimétrico de Dische (9) modificado por Gregory (10), en el cual el reactivo cromogénico Carbazol reacciona cuantitativamente con el furfural proveniente del azúcar, cuando se trata con H_2SO_4 -Borato. Este método da una reacción coloreada de alta especificidad y sensibilidad, que se lee a 530 nm en el Spectronic 20 (B&L). Como solución patrón fue utilizada una dilución comercial de ácido glucurónico, preparada en condiciones similares.

Con el objeto de asegurar una reproductividad en los valores obtenidos, el método fue ensayado con diferentes concentraciones de ácido glucurónico para construir una curva de calibración, la cual resultó lineal (Ley de Beer aplicable) entre límites de concentración de 5 a 50 microgramos (Fig. 2).



RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo utilizando la técnica de Schiller y colaboradores para la precipitación y separación de polisacáridos ácidos y la técnica de Dische-Gregory para la determinación cuantitativa de los ácidos urónicos en cerebro de ratón adulto normal, se encuentran consignados en la tabla II.

TABLA II

CONCENTRACION DE ACIDOS URONICOS EN CEREBRO DE RATON
(MICROGRAMOS/G TEJIDO)

EXPERIMENTO	I	II	III	IV	V	VI	PROMEDIO (DS)	% DEL TOTAL
FRACCION								
F. I	8,99	18,20	23,20	14,01	13,54	15,34	15,54 ± 4,7	36,5
F. II	14,39	12,67	23,69	34,73	19,79	21,84	21,18 ± 7,8	49,8
F. III	2,24	7,00	5,39	7,42	6,25	6,75	5,84 ± 4,2	13,7
PESO DE LOS CEREBROS (g)	4,446	4,141	4,220	3,941	4,800	4,074		

Los valores obtenidos para las diferentes fracciones demuestran que el contenido de la fracción II es mayor que la fracción I y III. Sin embargo en base a los resultados estadísticos, la diferencia de las fracciones I y II no resultan significativas.

A pesar de que los procedimientos empleados no permiten distinguir entre los diferentes polisacáridos, estudios electroforéticos realizados por otros investigadores en las mismas fracciones de SNC en rata y oveja (14; 15) han demostrado que la fracción I (0,4 M ClNa) está constituida principalmente por ácido hialurónico, la fracción II (1,2 M ClNa) tiene una movilidad electroforética similar al condroitin sulfato, pudiendo estar compuesta esta fracción por condroitin 4 sulfato, 6 sulfato y dermatan sulfato y la fracción III corresponde a la heparina.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos demuestran que las concentraciones del condroitinsulfato y del ácido hialurónico son muy

relacionables y que estos se encuentran en mayor proporción que la heparina.

Estos resultados concuerdan con los valores encontrados por Singh y Bachhawat, utilizando procedimientos similares en cerebro de ovejas adultas y en cerebro de ratas jóvenes (9 días de nacidas) (15).

Sin embargo los valores reportados por los mismos autores en cerebro de rata adulta indican que el contenido de condroitinsulfato es ligeramente mayor que el ácido hialurónico.

Custod y Young (8) analizando el cerebro de gato adulto normal, observan que los niveles de ácido hialurónico en preparación de tejido seco libre de lípidos, son ligeramente mayores que los de condroitin sulfato. La diferencia que se observa en la concentración de estos compuestos en tejido cerebral de diversos animales permiten sugerir que el contenido de estos polisacáridos es particular de cada especie; observación que ha sido también reportada por Onodera y colaboradores (13) al estudiar otros vertebrados como mono, conejo y bovino.

Es muy probable que los MPA desempeñen un papel importante en las funciones del sistema nervioso central, tanto en el proceso de mielinización (2, 17, 18) como en su maduración. Singh y Bachhawat (15) han demostrado que estos compuestos sufren marcado incremento en los primeros días del nacimiento del animal, lo cual aporta evidencia a esta hipótesis.

Otro papel importante atribuido a los MPA (1, 17) es su intervención en la conducción del impulso nervioso, actuando como intercambiadores de iones, Na^+ y K^+ .

Sin embargo para poder determinar el papel que tienen estos polisacáridos en el funcionamiento del sistema nervioso central debe realizarse un estudio completo mediante procedimientos bioquímicos, histoquímicos, fisiológicos y farmacológicos que permitan obtener una clara visión de su funcionamiento.

Acid mucopolysaccharides in the central nervous system of swiss albino mice. Biochemical analysis.

Luengo-Narváez G (Departamento de Biología y Química, Facultad de Humanidades y Educación, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela) Castejón HV and Ryder E. **Invest Clin** 13 (1): 28-37, 1972.- The concentration of uronic acids, in different fractions separated by the method of Schiller and col from swiss albino mice brain, were determined.

Fractions I (hyaluronic acid) and II (chondroitin-4-sulphate, 6-sulphate and dermatan-sulphate) represented the 86.3% of the total concentration of uronic acids while the 13.7% corresponded to fraction III (heparin). No significant difference between the levels of fraction I and II were found.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ABOOD LG, ABUL-HAJ SK: Histochemistry and characterization of hyaluronic acid in axons of peripheral nerve. *J Neurochem* 1: 119-125, 1956.
- 2- BRANTE G: Hexosamine compounds in the nervous system. A preliminary report. *Metabolism of The Nervous System*. Richter R (edit). Pergamon Press. New York. p 112-120, 1957.
- 3- CASTEJON HV: Demostración histoquímica de glucosaminoglucanos ácidos (mucopolisacáridos) intraneuronales en el sistema nervioso central (Resumen). *Acta Científica Venezolana* 19: 13, 1968.
- 4- CASTEJON HV: Histochemical demonstration of acid glycosaminoglycans in the nerve cell cytoplasm of mouse central nervous system. *Acta Histochemica (JENA)* 38: 55-64, 1970.
- 5- CASTEJON HV: Histochemical demonstration of sulphated polysaccharides at the surface coat of nerve cells in the mouse central nervous system. *Acta Histochemica (JENA)* 38: 55-64, 1970.
- 6- CASTEJON HV: Histochemical study of the neuronal acid glycosaminoglycans in the central nervous system of various species of vertebrates. *Acta Científica Venezolana* 22 (Sup. 2): R-24, 1971.
- 7- CLAUSEN J, HANSEN A: Acid mucopolysaccharides of human brain: identification by means of infra-red analysis. *J Neurochem* 10: 165-168, 1963.
- 8- CUSTOD JT, YOUNG IJ: Cat brain mucopolysaccharides and their in vivo hyaluronidase digestion. *J Neurochem* 15: 809-813, 1968.
- 9- DISCHE Z: A new specific color reaction of hexuronic acids. *J Biol Chem* 167: 189-198, 1947.
- 10- GREGORY JD. The effect of borate on the carbazole reaction. *Arch Biochem* 89: 157-159, 1960.

- 11- KURIYAMA K, ROBERTS E, KAKEFUDA T: Association of the gammaaminobutyric acid system with a synaptic vesicle fraction from mouse brain. *Brain Research* 8: 132-152, 1968.
- 12- MARGOLIS RU: Acid mucopolysaccharides and proteins of bovine whole brain, white matter and myelin. *Biochim Biophys Acta* 141: 91-102, 1967.
- 13- ONODERA K, HIRONA S, HORIUCHI F, KASHIMURA N: A comparative study of some animal brains with regard to content of acidic mucopolysaccharide. *Carbohydrate Rec* 3: 234-238, 1966.
- 14- SCHILLER S, SOLVER GA, DORFMAN A: A method for the separation of acid mucopolysaccharides: its application to the isolation of heparin from the skin of rats. *J Biol Chem* 236: 983-987, 1961.
- 15- SINGH M, BACHHAWAT BK: The distribution and variation with age of different uronic acid-containing mucopolysaccharides in brain. *J Neurochem* 12: 519-525, 1965.
- 16- SINGH M, BACHHAWAT BK: Isolation and characterization of glycosaminoglycans in human brain of different age groups. *J Neurochem* 15: 249-258, 1968.
- 17- SZABO MM, ROBOZ-EINSTEIN E: Acidic polysaccharides in the central nervous system. *Arch Biochem* 98: 406-412, 1962
- 18- YOUNG IJ, ABBOD LG: Histological demonstration of hyaluronic acid in the central nervous system. *J Neurochem* 6: 89-94, 1960.

Recibido: 25-2-72

Aceptado: 24-5-72