



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS



TESIS DOCTORAL

GMD

Facultad Cs. Médicas
Biblioteca



TDM 2874

**Determinación de monosacáridos Ácido *N*-
acetilneuramínico (Neu5Ac), Ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-
D-galacto-nonónico (KDN) y *N*-acetilmanosamina (ManNAc)
y factores de riesgos sociodemográficos para enfermedades
crónicas no transmisibles según tipo dietario vegetariano y no
vegetariano**

Tesis para optar el título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Gerardo N. Guerrero-Flores

Director: Fabio J. Pacheco

Codirectora: Fayth L. Miles

2025

Rosario, Argentina

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	i
AGRADECIMIENTOS	iv
PUBLICACIONES	vi
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ácidos siálicos	1
1.1.1. Estructura de los ácidos siálicos	1
1.1.2. Función de los ácidos siálicos	3
1.1.3. Síntesis de los ácidos siálicos	5
1.2 Desórdenes genéticos	9
1.2.1. Miopatía UDP-GlcNAc 2-epimerasa/ManNAc cinasa (GNE)	9
1.2.2. Enfermedad de almacenamiento de ácido siálico libre (FSASD)	10
1.3. Dieta y ácidos siálicos	11
1.3.1. Dieta	11
1.3.2. Microbioma intestinal y ácidos siálicos	12
1.4. Interacciones con patógenos	13
1.4.1. Ácidos siálicos y bacterias	14
1.5. Ácidos siálicos e interacciones virales	20
1.6. Ácidos siálicos y hongos	23
1.7. Ácidos siálicos y parásitos	25
1.8. Análisis de ácidos siálicos y enfermedades	28
2. PREGUNTA E HIPÓTESIS	40
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo general	41
3.2. Objetivos específicos	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS	42
4.1. Muestras humanas de tejido adiposo y suero	42
4.1.2. Consideraciones éticas	42
4.2. Descripción de procedimientos y técnicas	43
4.2.1. Equipo para cuantificación de monosacáridos	43
4.2.2. Preparación de muestras estándar	43
4.2.3 Análisis estadísticos con datos obtenidos en muestras de tejido adiposo	44

4.2.4 Análisis estadísticos con datos obtenidos en muestras de suero	44
5. RESULTADOS	46
5.1. Objetivo específico 1	46
Extracción de ácidos siálicos del tejido adiposo	46
Extracción de ManNAc y Neu5Ac de muestras de suero	47
5.2. Objetivo específico 2	49
Curvas de calibración estándar para mediciones en muestras de tejido adiposo	49
Condiciones del sistema cromatográfico utilizado para la separación de monosacáridos en tejido adiposo	49
Parámetros operativos del espectrómetro de masas para la detección de monosacáridos en tejido adiposo.....	51
Niveles de ácidos siálicos en tejido adiposo animal	53
Niveles de ácidos siálicos en muestras de tejido adiposo humano	53
Condiciones del sistema cromatográfico utilizado para la separación de monosacáridos en suero	57
Parámetros operativos del espectrómetro de masas para la detección de monosacáridos en suero	57
Niveles de monosacáridos en muestras de suero.....	59
Validación del método LC-MS/MS para ManNAc, KDN y Neu5Ac séricos.....	60
5.3 Objetivo específico 3	63
Características de la población incluida en los análisis de tejido adiposo y suero	63
5.4 Objetivo específico 4	66
Asociaciones de los ácidos siálicos del tejido adiposo humano con los patrones dietéticos y el IMC	66
Asociación de ManNAc, KDN y Neu5Ac en muestras de suero con variables sociodemográficas e IMC	67
Probabilidad de hipertensión según concentraciones séricas de Neu5Ac y ManNAc	74
6. DISCUSIÓN	76
6.1. Ácidos siálicos, dieta y adiposidad	76
6.2. Influencia de la dieta sobre los ácidos siálicos y presencia en tejido adiposo.....	78
Contexto fisiológico y relevancia del tejido adiposo	78
Hallazgos del presente estudio y comparación entre grupos dietarios	78
Influencia antiinflamatoria del patrón vegetariano	79
Posible influencia indirecta del IMC y la adiposidad sobre los ácidos siálicos	79
Rol fisiopatológico de los ácidos siálicos en el tejido adiposo	80
6.3. Consideraciones metodológicas y limitaciones del estudio	80
Desafíos técnicos en la cuantificación de monosacáridos	80
Optimización del método analítico empleado.....	81
Optimización del método cromatográfico	81
Rendimiento y métodos previos.....	82
Fortalezas metodológicas del estudio	82
Limitaciones	83

6.4. Implicaciones clínicas y perspectivas futuras.....	83
Contexto general de los monosacáridos y relevancia clínica.....	83
Ácidos siálicos y diferencias demográficas observadas en el estudio.....	83
Mecanismos biológicos propuestos.....	85
Fortalezas y limitaciones metodológicas del análisis clínico.....	86
Perspectivas futuras y líneas de investigación	87
7. CONCLUSIONES	89
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

AGRADECIMIENTOS

Sentado, absorto en mis cavilaciones mientras esperaba mi almuerzo en un restaurante cercano a la Facultad de Medicina, una niña se me acercó de repente. Me sorprendieron sus ojos, un color que parecía miel mezclado con los tonos de una puesta de sol que se tornaba ámbar en el horizonte.

Tenía dos resaltadores en la mano.

“Estos son los dos últimos que tengo” —dijo—. “¿Te gustaría comprarlos?”

Todavía recuperándome de la imagen de sus ojos, le pregunté con picardía:

“¿Todavía funcionan?”, porque había notado sus manos manchadas con los marcadores.

“¡Sí, sí!”, respondió rápidamente.

“¿Tienes una servilleta?”

“No”, dije, “pero tengo un pedazo de papel”. Era una fotocopia de mi seguro de motocicleta.

Comenzó a trazar líneas para demostrar que los resaltadores funcionaban, y lo hicieron. Mientras continuaba, sentí cierta curiosidad y le pregunté:

“¿Sabes leer?”

“Sí” —respondió ella—, “pero... todavía tengo algunas dificultades”.

“Está bien —dije—. ¿Qué dice aquí?”

Ella, que apoyaba sus codos sobre la mesa, vaciló un poco, pero logró leer mi nombre. Contuve la respiración mientras lo intentaba de nuevo, esta vez enfocándose en mi segundo nombre, que, por alguna razón, parecía interesarle más.

Llegó mi almuerzo y, cuando tomé el papel y ella se iba, se dio vuelta diciendo:

“Adiós, Nataniel”.

Por un momento, sentí una sublime felicidad, del tipo que existe en encuentros efímeros. Juli, como me había dicho que se llamaba, no podía tener más de once o doce años, recorriendo las calles sin “nada más” que ofrecer que un par de resaltadores.

Aquel breve encuentro me recordó que el conocimiento también se construye en lo simple, en lo que ocurre de forma ordinaria y —a veces— extraordinaria en la vida, entre risas y llantos, así como en encuentros transitorios inesperados, de aquellos que vienen y van. Después de todo, el conocimiento se sostiene necesariamente en la convivencia con otros. A esa otredad que, como Juli, en días más o menos difíciles me acercó a esa felicidad serena e inefable durante esta danza de ciencia y convivencia...

¡Gracias!

Seamos juntos o seamos nada.

Gerardo

PUBLICACIONES

A continuación, son detallados los resúmenes de eventos académicos y científicos asistidos en el contexto de esta tesis doctoral:

1. Guerrero-Flores,G.N., Pacheco,F.J.Boskovic,D.S., Sandaly O.S. Pacheco, Zhang,G., Gary Fraser,G., y Miles, F.L. (2022). **Neu5Ac y KDN en tejido adiposo de participantes vegetarianos y omnívoros de la cohorte Adventist Health Study-2.** *IV Congreso Latinoamericano y II Congreso Argentino de Medicina del Estilo de Vida*, Entre Ríos, Argentina.
2. Guerrero-Flores,G.N., Boskovic,D.S., Pacheco,F.J., Zhang,G., Gary Fraser,G., and Butler, F.M. (2023). **Sialic acids Neu5Ac and KDN in adipose tissue samples from individuals following habitual vegetarian or non-vegetarian dietary patterns.** *26th Annual Basic Sciences Research Symposium* -Hosted by the School of Medicine of Loma Linda University, California, United States.
3. Pacheco,F.J., Guerrero-Flores,G.N., Boskovic,D.S., Zhang,G., Gary Fraser,G., and Butler, F.M. (2023). **Sialic acids Neu5Ac and KDN in adipose tissue samples from individuals following habitual vegetarian or non-vegetarian dietary patterns.** *V Congresso Sul-Americano de Pesquisa na Educação Adventista – COSUDI*, Bahia, Brasil.
4. Guerrero-Flores,G.N., Boskovic,D.S., Pacheco,F.J., Zhang,G., Gary Fraser,G., and Butler,F.M. (2024). **Quantitative Hydrophilic Interaction Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Neu5Ac and ManNAc in Human Serum.** *V Congreso Argentino de Espectrometría de Masas de la Sociedad Argentina de Espectrometría de Masa*, Buenos Aires, Argentina.
5. Guerrero-Flores,G.N., Pacheco,FJ., Martinez Marignac,V.L., Perry, CC., Zhang, G., Mayta, M.L., Voglmeir, J., Liu, L., Fraser, G.E., Butler, F., and Boskovic, D.S. (2025). **Simultaneous ManNAc and Neu5Ac Quantification by LC-MS/MS in Adventist Health Study 2 Cohort Sera.** *Congreso Científico de Universidades Adventistas Latinoamericanas*, Medellín, Colombia.

A continuación, son detalladas las publicaciones realizadas en el contexto de esta tesis doctoral:

1. Guerrero-Flores, G. N., Pacheco, F. J., Boskovic, D. S., Pacheco, S. O. S., Zhang, G., Fraser, G. E., & Miles, F. L. (2023). **Sialic acids Neu5Ac and KDN in adipose tissue samples from individuals following habitual vegetarian or non-vegetarian dietary patterns.** *Scientific Reports*, 13(1), 12593. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38102-z>
2. Guerrero-Flores, G.N., Carlino, B., Gili, R.V., Leeson, S., Mayta, M.L. (2024). **Phytochemicals for Preventing and Treating Chronic Diseases.** In: Khoobchandani, M., Ghosh, S. (eds) Medicinal Applications of Phytopharmaceuticals. *Springer*, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-63677-6_4X.
3. Guerrero-Flores, G.N., Miles, F.L., Martinez Marignac, V.L., Zhang, G., Pacheco, F.J. and Boskovic, D.S. (2025). **Sialic Acids in Health and Disease.** *Biologics*, 5, 10. <https://doi.org/10.3390/biologics5020010>
4. Carlino B., Guerrero-Flores, G.N., Niclis, C., Siapco, G., and Mayta M. (2025). **Harnessing Metabolomics to Advance Nutrition-Based Therapeutics for Inflammation: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials.** *Metabolites*, 15, 705. <https://doi.org/10.3390/metabo15110705>.
5. Guerrero-Flores, G.N., Pacheco, F.J., Martinez Marignac, V.L., Perry, C.C., Zhang, G., Mayta, M.L., Voglmeir, J., Liu, L., Fraser, G.E., Butler, F., and Boskovic, D.S. (2026). **Simultaneous ManNAc and Neu5Ac Quantification in Human Sera by LC-MS/MS.** *Int. J. Mol. Sci.* 27(2), 894. <https://doi.org/10.3390/ijms27020894>
6. Guerrero-Flores, G.N. (2026). **What my PhD taught me about when persistence stops helping.** Research Communities by *Springer Nature*.

ABREVIATURAS

aa: Aminoácido

Ab: Anticuerpo

AC: Adenilil ciclasa

ACE2: Enzima convertidora de angiotensina 2

ADP: difosfato de adenosina

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

ATP: trifosfato de adenosina

Cmah: hidroxilasa citidina monofosfato ácido-N-acetilneuramínico

CMP: citidina monofosfato

CTP: citidina trifosfato

GAGs: glicosaminoglicanos

GlcNAc: N-acetilglucosamina

GNE: UDP-GlcNAc 2-epimerasa/ManNAc quinasa

GD2: Diasilgangliósido 2

GM2: Monoasilgangliósido 2

GlmM: fosfoglucosamina mutasa

GlmS: glucosamina-6-fosfato sintasa

GlmU: glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa/N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa

GPI: glucosa-6-fosfato isomerasa

HILIC: hydrophilic liquid interaction chromatography

KDN: ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonónico

LC-MS/MS: cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem

Man: manosa

ManNAc: N-acetilmanosamina

MS: espectrometría de masas

Neu: ácido neuramínico

NeuA: ácido siálico sintasa A

NeuB: ácido siálico sintasa B

NeuC: ácido siálico sintasa C

Neu5Ac: ácido N-acetilneuramínico

Neu5Gc: ácido N-glicolilneuramínico

NulO: ácido nonulosónico

PEP: fosfoenolpiruvato

ROS: especies reactivas de oxígeno

SLeA: sialyl-Lewis A

SLeX: sialyl-Lewis X

STn: sialil-Tn

SARS-CoV-2: coronavirus relacionado con el síndrome respiratorio agudo grave 2

UDP: Uridina difosfato

RESUMEN

El ácido ketodeoxynonulosónico (KDN), el ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) y su precursor, la *N*-acetil-D-manosamina (ManNAc), son componentes esenciales de la glicosilación, que participan en diversos procesos fisiológicos. La distribución y concentración de estos compuestos en el tejido adiposo y el suero humanos aún no han sido suficientemente estudiadas, especialmente en relación con los tipos dietarios, estado de salud y aspectos sociodemográficos. Se desarrollaron y validaron métodos analíticos por LC-MS/MS para la cuantificación simultánea de ácidos siálicos y precursores, particularmente, en tejido adiposo y muestras de suero. La fase móvil utilizada en la separación cromatográfica se estableció en gradiente binario. Dada la naturaleza de las moléculas estudiadas, se utilizó una columna HILIC (hidrofílica) para lograr la separación eficiente de estos analitos en las diferentes matrices. La columna fue mantenida a 30 °C constantemente. El sistema HPLC estuvo acoplado con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Los datos de espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS) se combinaron con espectrometría de masas en tándem en modo de iones negativos o positivos. El método desarrollado tiene alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, con límites de detección cercanos a 1 ng/mL. Se analizó un grupo de 156 muestras de tejido adiposo de participantes del Estudio de Salud Adventista-2 (AHS-2). En tejido adiposo, las concentraciones medias de Neu5Ac fueron mayores en veganos (17,1 ng/mL; 95% IC: 12,45 - 23,58) y ovolactovegetarianos (12,7 ng/mL; 95% IC: 9,23 - 17,49) que en omnívoros (9,8 ng/mL; 95% IC: 7,0 - 13,6), $p = 0,01$ y $p = 0,02$, respectivamente. Se observó una asociación inversa entre niveles de KDN y el índice de masa corporal (modelo 1, β : $-0,023 \pm 0,009$, $p=0,013$; modelo 2, β : $-0,020 \pm 0,009$, $p= 0,02$). En 155 muestras de suero analizadas de este grupo, los niveles de Neu5Ac conjugado y total fueron significativamente más altos en las mujeres (β : $-0,106$ ng/mL, 95% IC: $-0,200, -0,010$; β : $-0,107$, 95% IC: $-0,200, -0,010$), $p = 0,029$ y $p = 0,026$, respectivamente. Las concentraciones de Neu5Ac libre fueron de 594 ± 421 ng/mL en participantes negros y de 439 ± 168 ng/mL en participantes blancos. Así mismo, los niveles de ManNAc conjugados y totales

fueron más altos en los participantes negros, $1,80 \pm 0,808$ y $1,90 \pm 0,826$ $\mu\text{g/mL}$, en comparación con $1,31 \pm 0,518$ y $1,40 \pm 0,526$ $\mu\text{g/mL}$ en los participantes blancos (ambos casos, $p < 0,001$). El ManNAc libre fue de $93,1 \pm 36,2$ ng/mL en los participantes negros y de $89,0 \pm 20,2$ ng/mL en los blancos. Los sujetos con mayor IMC y mayor edad tienden a tener más concentración de ManNAc libre, $\beta: 0,006$ ($0,000 - 0,013$), $p = 0,040$ y $\beta: 1,070$ ($1,030 - 1,100$), $p \leq 0,001$, respectivamente. Estos últimos también tienden a tener ManNAc total más elevado, $\beta: 0,004$, ($0,0002 - 0,0096$), $p = 0,045$. No hubo diferencias significativas entre los niveles séricos de Neu5Ac y ManNAc según tipo dietario. Adicionalmente, los modelos de regresión logística sugirieron una mayor probabilidad de hipertensión en función de las concentraciones de Neu5Ac conjugado y total, OR: 1,000 (95% IC: 1,000 - 1,000); OR: 1,000 (95% IC: 1,000 - 1,000), $p = 0,03$ y $p = 0,04$, respectivamente. Además, los modelos de regresión lineal mostraron asociación entre hipertensión y mayores niveles de Neu5Ac conjugado, $\beta: 5.754$ (95% IC: 74,2 - 11.430, $p = 0,047$; y ManNAc libre, $\beta: 18,5$ (95% IC: 0,19 - 36,90), $p = 0,048$. En conclusión, según el tipo de tejido y el estado de salud, los resultados revelan patrones diferenciales en la distribución de los monosacáridos estudiados en muestras humanas, de acuerdo con el IMC y algunas características sociodemográficas. El presente método desarrollado de cuantificación por LC-MS/MS constituye una herramienta útil para futuras investigaciones orientadas a comprender el papel de estos azúcares en la fisiopatología y el pronóstico de las enfermedades crónicas no transmisibles.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ácidos siálicos

Las superficies celulares están cubiertas por un glicocálix ¹ compuesto por polímeros de carbohidratos complejos (también conocidos como glicanos) anclados a las membranas celulares a través de enlaces de glicoproteínas o glicolípidos ²⁻⁵. Derivados biosintéticamente del ácido neuramínico ^{6,7}, los ácidos siálicos representan una familia de ácidos ceto-aldónicos de nueve carbonos (ácidos nonulosónicos (NulOs)) ⁸. Estos normalmente ocupan las posiciones terminales de las fracciones de glicosaminoglicanos de la superficie celular ^{9,10}. Sin embargo, también están presentes libremente en diversos biofluidos o como modificadores de las proteínas solubles secretadas ¹¹⁻¹³. Los ácidos siálicos se encuentran en una amplia gama de filos animales, incluidos los *Platyhelminthes* ¹⁴, *Echinodermata* ¹⁵, *Cephalopoda* ¹⁶, *Crustacea* ¹⁷, *Cephalochordata* ¹⁸ y *Vertebrata* ¹⁹. Además, también se sabe que los ácidos siálicos están presentes en virus, bacterias, protozoos y hongos ²⁰⁻²². En consecuencia, no es sorprendente que los ácidos siálicos estén involucrados en una gran variedad de funciones fisiológicas, como la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) ²³, interacciones célula-célula, unión a receptores y señalización celular ^{9,13,24}. Además, los ácidos siálicos desempeñan también un papel relevante en algunos procesos patológicos, como los trastornos cardiovasculares y el cáncer ²⁵⁻²⁷.

1.1.1. Estructura de los ácidos siálicos

Los ácidos siálicos constituyen una familia de más de 50 moléculas distintas, 15 de las cuales se han identificado en tejidos humanos ^{9,25}. Las diferencias entre los ácidos siálicos se basan en grupos modificadores particulares ligados a *N* o ligados a *O*, como *N*-acetil-, *N*-glicolilo y *O*-acetil, o, con menos frecuencia, los grupos *O*-lactilo, *O*-metilo y *O*-sulfato (Figura 1) ^{10,28,29}. Las modificaciones confieren propiedades distintivas a los azúcares de nueve carbonos, que respaldan sus funciones fisiológicas específicas ¹². Dos características estructurales principales incluyen un grupo amino modificado a menudo en la posición 5 y un grupo carboxilo en la posición 1. Este grupo carboxilo, con su característico pKa de aproximadamente 2.2, confiere una carga negativa al ácido siálico dentro de un amplio rango de pH fisiológico ^{10,13}. La esterificación de los grupos hidroxilo en las posiciones 7, 8 o 9 con ácido acético, en forma de *O*-acetilación, ocurre con menos

frecuencia ¹⁰. Otras modificaciones conocidas incluyen la sulfatación o metilación en la posición 8 o la lactilación en la posición 9. Las sustituciones pueden ocurrir en múltiples sitios, como lo ilustra el ácido 7,8,9-tri-O-acetil-N-acetil- y N-glicolilneuramínico ^{8,9,30}.

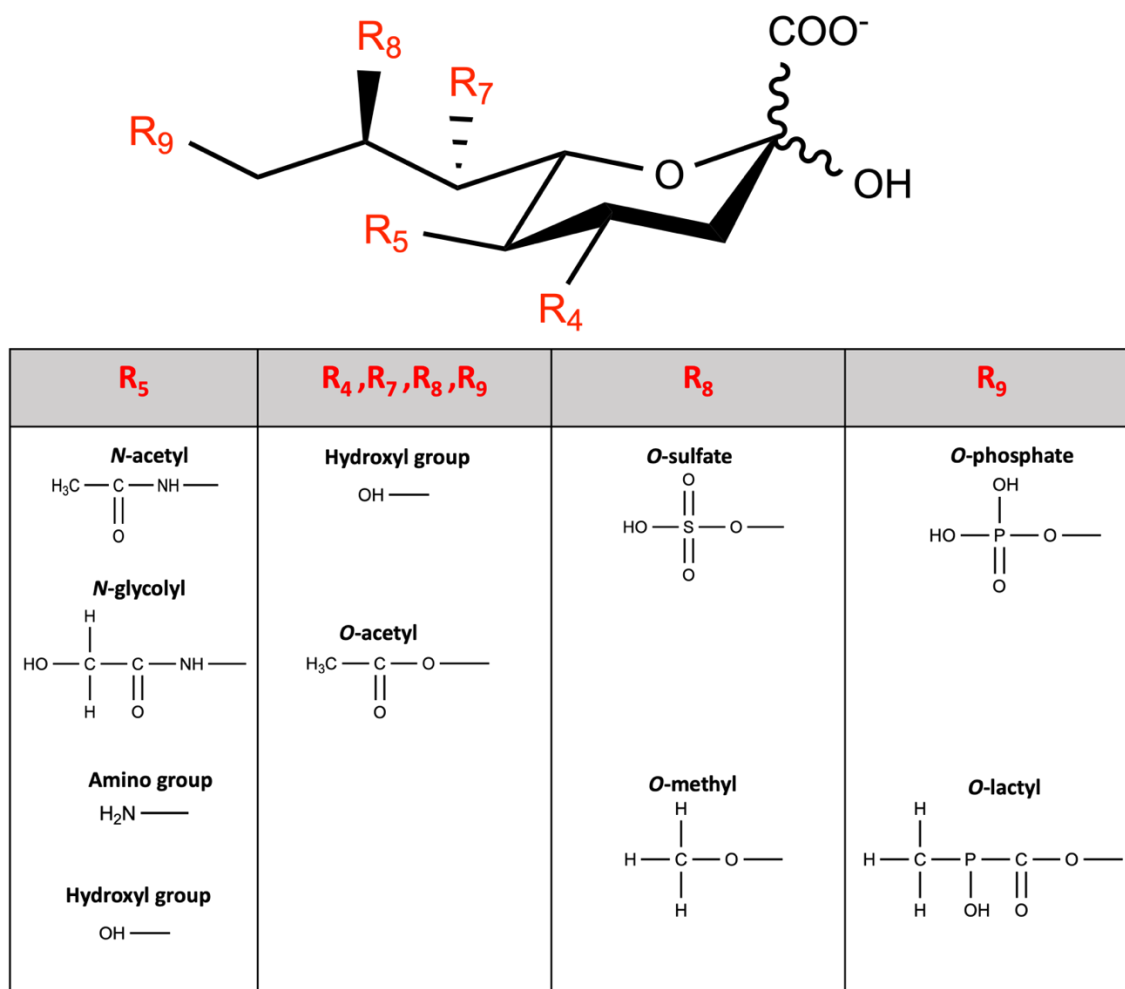


Figura 1. La estructura molecular del ácido siálico y sus variantes bajo diversas condiciones fisiológicas. Los ácidos siálicos se caracterizan por tener un grupo carboxilo en el carbono 1 (C1), unido al carbono anomérico C2. Las líneas onduladas en C1 significan que no se ha especificado la configuración anomérica α o β . Los sustituyentes naturales más comunes (posiciones indicadas entre paréntesis) son una cadena lateral similar al glicerol (C7, 8 y 9) que se proyecta fuera del anillo, y un grupo amino acilado en C5. Diferentes grupos con metilo, lactilo, acetilo, glicolilo o sulfato pueden diversificar adicionalmente los ácidos siálicos. Preparado con ChemDraw, ver.: 23.1.2.7. Extraído de: Guerrero-Flores, G.N., et al. (2025). Sialic Acids in Health and Disease.

Ampliamente distribuidos en una variedad de tejidos y fluidos humanos ³¹, los ácidos siálicos exhiben roles funcionales particulares asociados con sus características estructurales específicas

¹⁰. El miembro más común de esta familia es el *ácido N-acetilneuramínico* (Neu5Ac), con un grupo aminoacetilado en la posición 5 (Figura 2) ^{7,29}. Neu5Ac puede convertirse en un *ácido N-glicolilneuramínico* (Neu5Gc) menos común mediante la citidina monofosfato-N-acetilneuramínico hidroxilasa (Cmah), que hidroxiliza el grupo acetilo ^{9,29,32}. Otro miembro de la familia de los ácidos siálicos, que se encuentra principalmente en su forma libre ^{10,33,34} y generalmente se expresa a niveles más bajos que Neu5Ac o Neu5Gc en tejidos de mamíferos, es el *ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonónico* (KDN) ^{8,34–36}. En otras publicaciones se presentan análisis estructurales y estereoquímicos más profundos de los ácidos siálicos ^{10,28,37–40}.

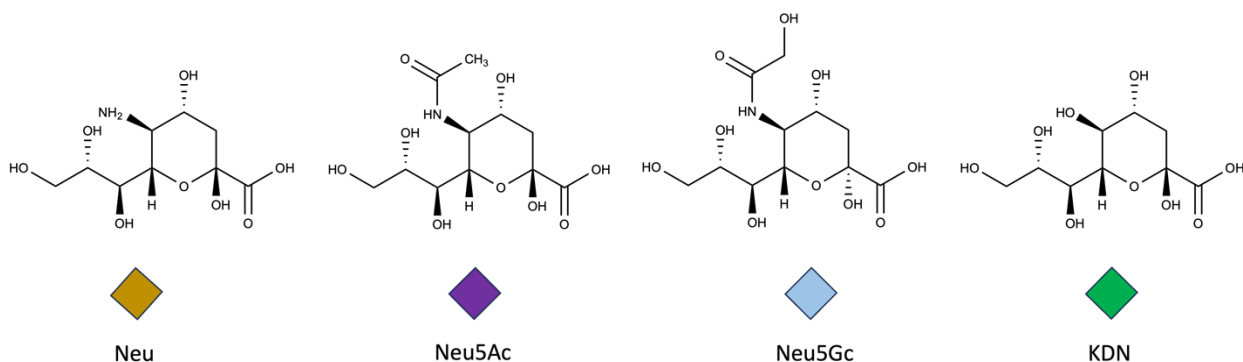


Figura 2. Las estructuras de los ácidos siálicos más comunes. La representación gráfica de estos glicanos se desarrolló de acuerdo con las directrices de la Nomenclatura de Símbolos para Glicanos (SNFG). Preparado con ChemDraw, versión: 23.1.2.7. Neu, ácido neuramínico; Neu5Ac, ácido N-acetilneuramínico; Neu5Gc, ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc); KDN, ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonónico. Extraído de: Guerrero-Flores, G.N., et al. (2025). Sialic Acids in Health and Disease.

1.1.2. Función de los ácidos siálicos

Los ácidos siálicos están involucrados en una variedad de funciones fisiológicamente importantes ^{25,41}, tales como: (a) protección antioxidante ⁴², (b) interacciones en la superficie celular ¹, (c) desarrollo óseo infantil y crecimiento esquelético ⁴³, (d) reconocimiento inmunológico ⁴⁴, (e) desarrollo del cerebro ^{43,45}, y (f) aprendizaje y memoria ⁴⁶.

Personas con miopatía por mutaciones en el gen UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa/N-acetilmannosamina quinasa (GNE) y modelos de ratón mutante por GNE, tienen músculos hiposialilados y proteínas muy modificadas a través de la S-nitrosilación, mientras que los genes que responden al estrés oxidativo están significativamente regulados al alza ⁴⁷. En ambos casos, la producción de ROS se elevó con la hiposialilación celular ⁴⁷. Sin embargo, a través de la ingesta

de ácido siálico extrínseco, el aumento de la sialilación general redujo las ROS y la S-nitrosilación de proteínas. Además, el antioxidante oral N-acetilcisteína mejoró la atrofia muscular y la debilidad en *ratones con* mutación GNEt^{47,48}. En conjunto, esta línea de evidencia demuestra que la sialilación general se asocia con una mayor protección antioxidante y una mejor capacidad de reserva para manejar las ROS incidentales.

Una mutación bialélica en *el NANS* se asocia con un retraso grave del desarrollo con inicio en la infancia y displasia esquelética^{43,49}. El gen *NANS* es el responsable de codificar la sintasa para Neu5Ac^{43,50}. En consecuencia, el sustrato precursor inmediato se acumula, de modo que los fluidos corporales de los individuos afectados tendrán niveles elevados de *N*-acetil-D-manosamina⁴³. El knockdown de *nansa*, un ortólogo de pez cebra para el gen *NANS humano*, resultó en un desarrollo esquelético anormal, mientras que el ácido siálico agregado exógenamente rescató parcialmente este fenotipo esquelético. Por tanto, la síntesis de ácido siálico mediada por NANS es necesaria para el crecimiento temprano del esqueleto⁴³.

El glicocálix es fundamental para el reconocimiento inmunitario y la inhibición de puntos de control, lo que permite la detección de patógenos y la activación de las defensas inmunitarias^{44,51}. Esta cubierta de carbohidratos sirve como una barrera celular que puede facilitar o dificultar las interacciones de las células inmunitarias. Dependiendo del tipo de célula y de la composición de la capa de glicosaminoglicanos, el sistema inmunitario puede identificarla como propia. Alternativamente, los patógenos también pueden protegerse potencialmente de la detección inmune al enmascarar sus superficies antigénicas con ácidos siálicos. Alternativamente, la capa rica en ácido siálico también puede proteger potencialmente no solo a los patógenos sino a células cancerosas de la detección inmune⁵². Normalmente, para que las células cancerosas establezcan lesiones malignas, primero deben evadir el reconocimiento por parte de las células inmunitarias^{53,54}. Lo logran adaptando su glicocálix, que cubre sus neoantígenos y otros ligandos, protegiéndolos de las células del sistema inmunitario adquirido. Esto altera los esfuerzos fagocíticos de las células mieloides y cambia las respuestas inmunitarias normales⁵⁴. Esto explica la regulación positiva de las mucinas transmembrana y otras glicoproteínas altamente sialiladas en las células cancerosas, como una forma de establecer un glicocálix protector^{44,55,56}. En consecuencia, en modelos de ratón, se ha demostrado que las células tumorales con el blindaje de glicocálix superficial más eficiente tienen el mayor potencial metastásico⁵⁷.

El cerebro humano crece rápidamente en los primeros años de vida y requiere una nutrición adecuada ⁵⁸⁻⁶⁰. La lactancia materna mejora significativamente el desarrollo cognitivo de los lactantes ^{58,61,62}. Estos beneficios se han atribuido a los oligosacáridos de la leche humana, algunos de los cuales están relacionados con los ácidos siálicos ^{58,61,63}. Los ácidos siálicos son reconocidos como moléculas esenciales para el correcto desarrollo de los gangliósidos y, por lo tanto, como críticos para el desarrollo y la función del cerebro ⁵⁹. Se sabe que la suplementación dietética con ácido siálico u oligosacáridos sialilados mejora la inteligencia y el rendimiento cognitivo en los primeros y posteriores años de vida ^{59,60,64}. Del mismo modo, la suplementación exógena de ácido siálico en modelos animales aumenta su concentración en la corteza frontal y mejora el rendimiento del aprendizaje ⁶⁵. Como componente básico de las neuronas, la 3'-Sialilactosa dietética se asocia con un mejor desarrollo del lenguaje en los bebés ⁵⁸. Por el contrario, algunos trastornos del desarrollo intelectual se asocian a defectos genéticos que afectan a la síntesis de Neu5Ac endógeno ⁴³.

1.1.3. Síntesis de los ácidos siálicos

En los mamíferos, la síntesis de ácidos siálicos involucra más de 30 genes, enzimas codificantes y transportadores ubicados en varios compartimentos celulares ⁶⁶. La síntesis de Neu5Ac, cuyo precursor es la *N*-acetil-D-manosamina (ManNAc), comienza en el citosol con la glucosa (Figuras 3-4), que entra en la vía biosintética de la hexosamina (HBP). Esta vía fosforila la glucosa utilizando ATP para producir el metabolito clave uridina-5'-difosfo-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) ^{67,68}. Luego, el dominio epimerasa de UDP-*N*-acetilglucosamina 2-epimerasa/*N*-acetilmannosamina quinasa (GNE) media la formación del monosacárido no cargado *N*-acetilmanosamina (ManNAc) ⁶⁹, con escisión simultánea de UDP ⁷⁰⁻⁷². ManNAc es fosforilado por el dominio quinasa de GNE, lo que conduce a ManNAc-6P ⁷³. La ácido siálico sintasa (NANS) convierte ManNAc-6P en Neu5Ac-9P en una reacción de condensación con fosfoenol-piruvato (PEP) ³⁰, y posteriormente, la *N*-acetilneurámico-ácido fosfatasa (NANP) media la desfosforilación para producir Neu5Ac libre ⁷⁴. El monosacárido libre se activa en el núcleo mediante el acoplamiento con el monofosfato de citidina (CMP), a través de la acción de la CMP-*N*-acetilneuraminato sintetasa (CMAS), produciendo CMP-Neu5Ac ^{10,75}. A continuación, el CMP-Neu5Ac se añade a un lípido o proteína para formar glicanos en el aparato de Golgi ^{76,77}, o es transferido a cadenas de carbohidratos de glicoconjugados nacientes por sialiltransferasas (Figura 4) ^{10,13,25,78}. En este punto, el Neu5Ac acoplado puede alterarse aún más

a través de *O*-acetilación u *O*-metilación ⁷⁹, antes de que el glicoconjugado se transfiera a la superficie celular ⁷⁸.

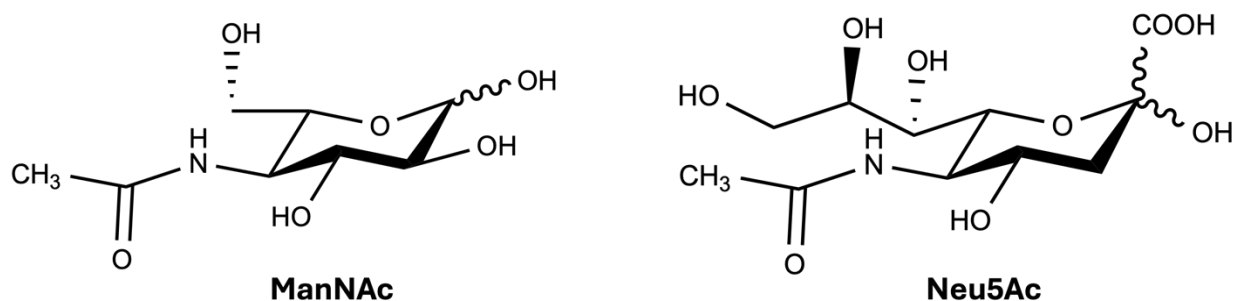


Figura 3. Estructuras moleculares de ManNAc and Neu5Ac. Preparado con ChemDraw, ver.: 23.1.2.7.

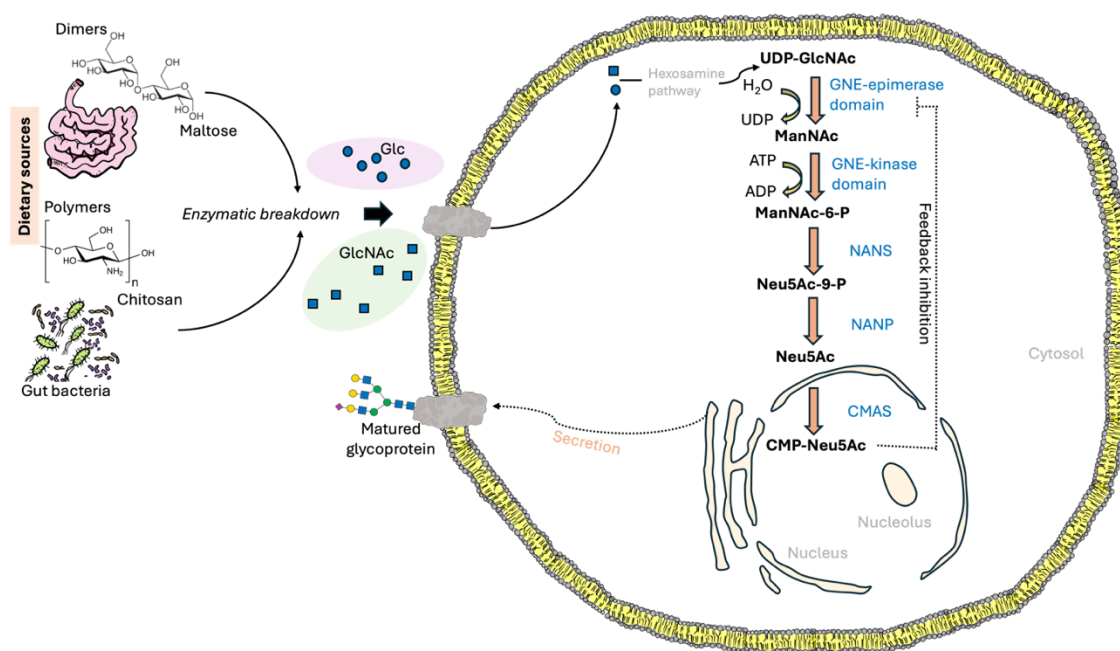


Figura 4. Síntesis de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) en células eucariotas. Los carbohidratos de la dieta llegan al intestino, donde varias enzimas bacterianas y del huésped los descomponen en monosacáridos. Por ejemplo, las enzimas del intestino del huésped, como la maltasa, descomponen los disacáridos como la maltosa en glucosa (Glc), mientras que las enzimas bacterianas descomponen polímeros como el quitosano para obtener N-acetilglucosamina (GlcNAc). Estos monosacáridos ingresan a las células a través de transportadores. Una vez en el citoplasma, estos azúcares participan en la vía de la hexosamina. La enzima uridina difosfo-N-acetilglucosamina 2-epimerasa/N-acetilmanosamina quinasa (GNE) es crucial para regular la producción de Neu5Ac. Cataliza dos pasos esenciales en la producción de Neu5Ac: a) la conversión de UDP-GlcNAc en ManNAc a través de la epimerización, y b) la fosforilación de ManNAc en ManNAc-6-P. Siguiendo estos pasos, la sintasa de ácido siálico (NANS) convierte ManNAc-6P en Neu5Ac-9P en una reacción de condensación con fosfoenol-piruvato (PEP). Posteriormente, la N-

acetilneuraminica-ácido-fosfatasa (NANP) media la desfosforilación para producir Neu5Ac, que luego se convierte en CMP-Neu5Ac en el núcleo. Tanto UDP-GlcNAc como CMP-Neu5Ac sirven como precursores para la biosíntesis de glicanos ligados a N. CMP-Neu5Ac juega un papel en la inhibición de la actividad de GNE a través de un mecanismo de retroalimentación. Extraído de: manuscrito del autor sometido en *Int. J. Mol. Sci.*: Manuscript ID ijms-4030742.

El Neu5Ac conjugado pasa por un proceso metabólico adicional a través de un sistema de reciclaje dinámico (Figura 5). Durante la endocitosis, el Neu5Ac presente en glicoconjugados es escindido por sialidasas (neuraminidasas) de glicoproteínas y glicolípidos presentes en el lisosoma⁸⁰. Es así como el Neu5Ac libre se transporta de vuelta al citoplasma a través de transportadores de sialina, donde puede reactivarse para la glicosilación o degradarse en N-acetilmanosamina y piruvato por la liasa N-acetilneuramínica (NAL)⁸¹.

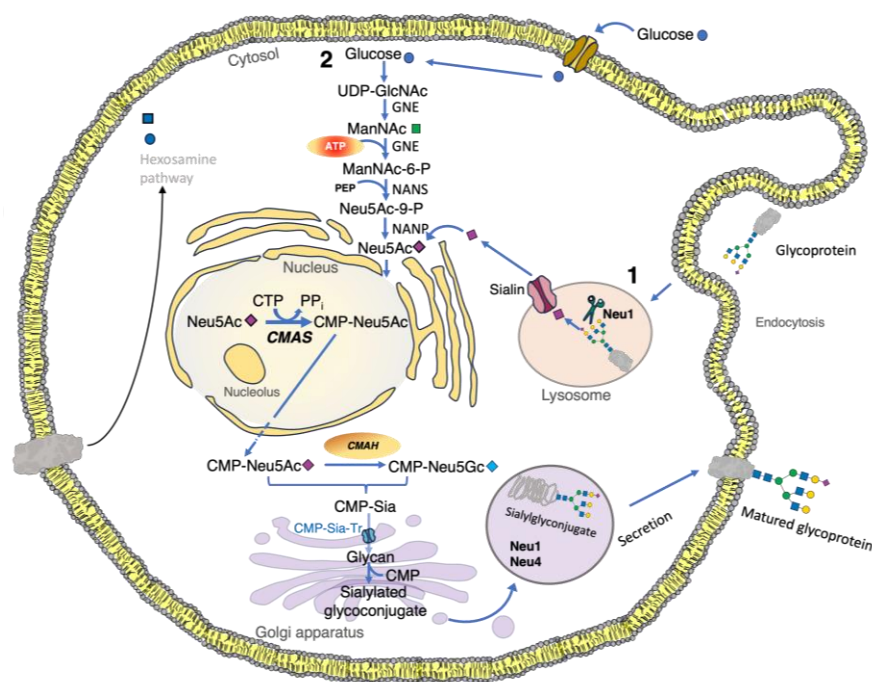


Figura 5. Metabolismo del ácido siálico en células eucariotas. (1) Las moléculas de ácido siálico que se encuentran en el citosol de las células eucariotas se obtienen de fuentes exógenas, como glicolípidos o glicoproteínas. (2) Los ácidos siálicos se pueden producir a partir de moléculas citosólicas UDP-GlcNAc, biosintetizadas a partir de la glucosa en la vía de la hexosamina. Finalmente, en el lisosoma, después de que Neu1 hidroliza el residuo terminal de ácido siálico de los glicoconjugados, el glicoconjugado sialilado es transportado por el transportador de sialilina codificado por el gen SLC17A5. CMAH: citidina monofosfato ácido-N-acetilneuramínico hidroxilasa; CMAS: CMP-N-acetilneuraminato sintetasa; CMP: citidina-5'-monofosfato; CMP-Sia-Tr, transportador de ácido siálico CMP en el aparato de Golgi, codificado por el gen SLC35A1; CTP: citidina-5'-trifosfato; ManNAc: N-acetilmannosamina;

ManNAc-6-P, N-acetilmannosamina 6-fosfato; ManNAc-9-P, N-acetilmannosamina 9-fosfato; Neu1, neuraminidasa 1; Neu4, neuraminidasa 4; PEP: fosfoenolpiruvato; PPi: pirofosfato; Sia, ácido siálico; Sialin, transportador de ácido siálico en el lisosoma; UDP-GlcNac, difosfato de uridina N-acetilglucosamina. Extraído de: Guerrero-Flores, G.N., et al. (2025). Sialic Acids in Health and Disease.

Otro miembro importante en la familia de los ácidos siálicos es el KDN. Su principal precursor de biosíntesis es la manosa (Man). La vía sintética comprende una serie de reacciones, similares a las de la biosíntesis de Neu5Ac (Figura 6) ^{68,82-84}. (1) $\text{Man} + \text{ATP} \rightarrow \text{Man-6-P} + \text{ADP}$; (2) $\text{Man-6-P} + \text{PEP} \rightarrow \text{KDN-9-P} + \text{P}_i$; (3) $\text{KDN-9-P} \rightarrow \text{KDN} + \text{P}_i$. La reacción 1, catalizada por una hexoquinasa, representa la 6-*O*-fosforilación de la manosa para formar D-manosa-6-fosfato (Man-6-P). La reacción 2, catalizada por la KDN-9-fosfato (KDN-9-P) sintasa, condensa Man-6-P y PEP para formar KDN-9-P. La reacción 3, catalizada por una fosfatasa, implica la desfosforilación de KDN-9-P para producir KDN libre ^{12,34,82}.

Aunque las funciones de KDN siguen sin estar claras, la presencia de la KDN sintasa (KDN-9-P) en vertebrados, incluidos los humanos, sugiere una relevancia fisiológica aún no comprendida ⁸⁵. El fino equilibrio entre síntesis y degradación de ácidos siálicos es de suma importancia para el correcto funcionamiento celular. Es por ello que junto con otros procesos, el funcionamiento de mecanismos de reciclaje asegura un suministro constante de ácidos siálicos y evita la acumulación de estos en la célula, subrayando la importancia de la homeostasis de Neu5Ac en condiciones fisiológicas normales pero también en condiciones patológicas ⁸⁶⁻⁸⁸.

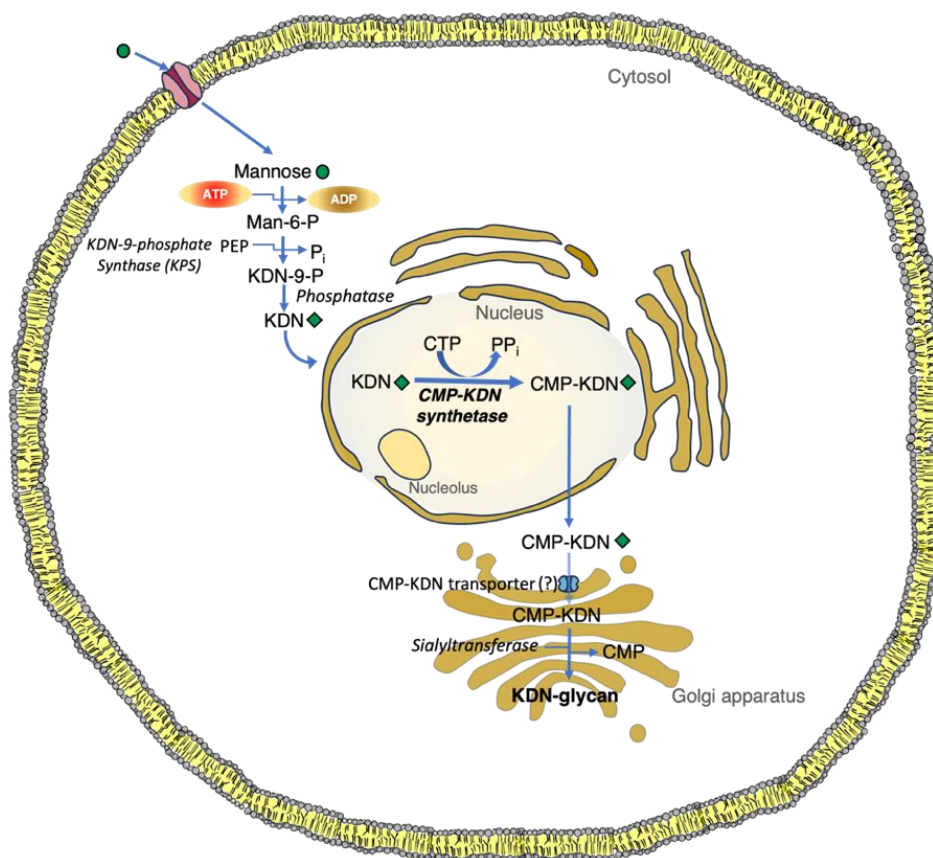


Figure 6. Vías *de novo* para la síntesis de KDN en células animales. Man-6-P, un epímero C2 de glucosa 6-fosfato, es un monosacárido precursor clave para KDN. La biosíntesis de KDN a partir de Man-6-P sigue pasos de reacción enzimática comparables a los de Neu5Ac de ManNAc-6-P. En particular, a diferencia de otros monosacáridos libres, la manosa es absorbida de manera eficiente por diferentes tipos de células utilizando un transportador que no responde a la glucosa. CMP, citidina-5'-monofosfato; CMP-KDN, citidina 5'-(fosfato 3-desoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulosónico); CMP-KDN-sintetasa, CMP-3-desoxi-d-glicero-d-galacto-nonulosónico ácido sintetasa; CTP, trifosfato de citidina; KDN-9-P, KDN-9-fosfato; Man-6-P, manosa-6-fosfato; Pi, fosfato inorgánico; PPi, pirofosfato. Extraído de: Guerrero-Flores, G.N., et al. (2025). Sialic Acids in Health and Disease.

1.2 Desórdenes genéticos

1.2.1. Miopatía UDP-GlcNAc 2-epimerasa/ManNAc cinasa (GNE)

La miopatía GNE es un trastorno miogénico hereditario que provoca debilidad muscular debido a un defecto en el propio músculo. El gen GNE proporciona instrucciones para la expresión de la enzima GNE bifuncional, que desempeña un papel clave en la síntesis de Neu5Ac^{48,89,90}. El dominio epimerasa N-terminal de GNE utiliza UDP-GlcNAc como sustrato y lo epimeriza en ManNAc por el dominio epimerasa, que luego es posteriormente fosforilado por el dominio quinasa de la enzima GNE^{69,90}.

Por lo general, los pacientes con miopatía GNE presentan síntomas musculares entre los 15 y los 35 años ⁸⁷. La fisiopatología de la enfermedad no se comprende completamente, pero se cree que la hiposialilación de los glicanos musculares juega un papel importante ^{48,89}. La presentación típica de la caída bilateral del pie en la edad adulta temprana es una consecuencia de debilidad en los músculos tibiales anteriores ⁸⁹. A lo largo de las décadas siguientes, la enfermedad progresa gradualmente, afectando paulatinamente a los músculos esqueléticos de todo el cuerpo ⁸⁹. Los músculos cuádriceps tienden a estar relativamente preservados hasta las etapas avanzadas de la enfermedad ^{48,87,89}.

Actualmente, se llevan a cabo ensayos clínicos de fase 2 con suplementación con ManNAc como intervención terapéutica para pacientes diagnosticados de miopatía GNE ^{69(p2),91}. En esta cohorte de pacientes se reportan pruebas preliminares de su seguridad y eficacia bioquímica a largo plazo, consistentes con el mecanismo de acción previsto ⁶⁹. Además, la suplementación con ManNAc restaura la biosíntesis intracelular de Neu5Ac en los sujetos afectados. Sorprendentemente, esta mejora se observa incluso en pacientes con mutaciones homocigóticas en GNE en el dominio de la quinasa ⁹¹.

1.2.2. Enfermedad de almacenamiento de ácido siálico libre (FSASD)

Los lisosomas son orgánulos citoplasmáticos que contienen una variedad de hidrolasas ⁸⁸. Una deficiencia genética en una de estas hidrolasas puede resultar en la acumulación de material para ser degradado por el lisosoma ⁹². A veces, dicho almacenamiento lisosomal puede ser causado por la deficiencia de una proteína activadora ^{93,94}. Alternativamente, la acumulación de material lisosomal también puede ocurrir debido a una deficiencia del transportador, como se observa en la enfermedad de Salla ^{95,96}. El daño al mecanismo de transporte de Neu5Ac libre a través de la membrana lisosomal conduce a la acumulación lisosomal de Neu5Ac ^{97,98}. Los trastornos del almacenamiento de ácido siálico libre lisosomal constituyen un espectro de trastornos poco frecuentes, autosómicos recesivos, neurodegenerativos y multisistémicos causados por un defecto en el exportador del ácido siálico (sialina) de la membrana lisosomal (Figura 5) ⁹⁹⁻¹⁰¹.

Las variantes genéticas patógenas bialélicas de SLC17A5, que codifican sialina, producen tres formas de trastornos del almacenamiento de ácido siálico libre: (a) enfermedad de Salla, (b) enfermedad de Salla grave intermedia y (c) enfermedad de almacenamiento de ácido siálico libre

infantil ^{95,101}. La enfermedad de Salla y la enfermedad de almacenamiento de ácido siálico libre infantil ejemplifican las manifestaciones más leves y más graves del espectro fenotípico de FSASD, respectivamente ⁹⁵. A los seis meses de edad, los lactantes con enfermedad de Salla suelen manifestar hipotonía, ataxia, retraso en el desarrollo y, en la mayoría de los casos, hipomielinización ^{96,102}. A esto le sigue un deterioro neurológico gradual en una esperanza de vida casi normal ¹⁰². Por el contrario, la enfermedad infantil por almacenamiento de ácido siálico libre se caracteriza por hidropesía fetal no inmune (24%), hepatoesplenomegalia, retraso del crecimiento, retraso grave del desarrollo, cardiomegalia, pies zambos, rasgos faciales cada vez más toscos, deterioro neurológico y muerte prematura ¹⁰³. La enfermedad de Salla grave intermedia recientemente descrita representa individuos con un fenotipo intermedio ¹⁰⁴. Los pacientes suelen presentar dentro de los primeros seis meses de vida hipotonía grave y retraso en el desarrollo, que progresa gradualmente a ataxia, espasticidad y epilepsia ⁹⁵.

1.3. Dieta y ácidos siálicos

1.3.1. Dieta

Además de su producción endógena, los ácidos siálicos también pueden obtenerse de fuentes dietéticas, absorberse por el intestino y transportarse a través de la circulación a los tejidos ^{91,105,106}. La mayoría de los ácidos siálicos comunes se obtienen a través de fuentes dietéticas ¹⁰⁷, ya sea de carne roja, en forma de cordero, cerdo o ternera, o de una variedad de productos lácteos ^{108,109}. El Neu5Ac exógeno puede ser absorbido por las células a través de la pinocitosis líquida y un transportador lisosomal ¹¹⁰. A diferencia del Neu5Ac, el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) no puede ser sintetizado por tejidos humanos a partir de precursores endógenos ¹¹¹. En cambio, se incorpora metabólicamente en los tejidos de los sujetos que consumen carne roja, lácteos y derivados ^{112–114}. En consecuencia, mínimas cantidades de Neu5Gc derivado de la dieta se expresan en la superficie de células endoteliales y algunas epiteliales ^{32,115}. Una vez que los ácidos siálicos son internalizados por las células en el citosol ¹⁰⁵, son integrados con glicoconjugados endógenos, de los cuales una fracción relativamente pequeña se retiene en el cuerpo, mientras que el resto se metaboliza y excreta en la orina ^{115,116} o heces ⁹¹.

A diferencia de los animales, se sabe que las plantas carecen de ácidos siálicos ^{97,117,118}. Sin embargo, son ricas fuentes de precursores para la síntesis de ácidos siálicos ^{7,68,83,118}. En los peces, el Neu5Ac *O*-acetilado se encuentra con frecuencia en los *N*-glicanos, mientras que también se

observa un número menor de estructuras disialiladas como el Neu5Ac α 2-8Neu5Ac¹¹⁹. Neu5Gc se ve muy raramente en ciertas fuentes marinas (huevos de peces o equinodermos)^{105,120,121}, y aparentemente no es sintetizado por aves o reptiles^{122,123}.

Los destinos metabólicos precisos y las contribuciones relativas de los ácidos siálicos de fuentes endógenas y dietéticas en los seres humanos siguen siendo desconocidas, lo que dificulta las inferencias de los modelos actuales¹¹⁵. Las implicaciones de la absorción dietética y la utilización de Neu5Ac y Neu5Gc merecen una mayor investigación.

1.3.2. Microbioma intestinal y ácidos siálicos

Los polisacáridos vegetales incluyen glicanos de cadena larga, como componentes de la fibra de origen vegetal, que los animales generalmente no pueden digerir¹²⁴. Sin embargo, la fibra es una fuente esencial de carbono y energía que favorece el mantenimiento y el funcionamiento de la microbiota intestinal¹²⁵. Estas bacterias intestinales, que son capaces de utilizar varios tipos de glicanos vegetales¹²⁵, se clasifican en siete divisiones predominantes: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*. De estos, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* representan más del 90% del microbioma¹²⁶. Se sabe que las bacterias intestinales son esenciales para la salud humana ya que a) confieren una capacidad adicional de recolección de energía, b) proporcionan exclusión de patógenos en un nicho, c) producen vitaminas y glicanos, y d) llevan a cabo actividades de comunicación molecular, todas las cuales forman parte integral de los procesos fisiológicos humanos^{125,127,128}. Por lo tanto, la cantidad y calidad de los glicanos vegetales consumidos diariamente por el huésped humano pueden tener un impacto en la salud¹²⁵. Tanto los estudios preclínicos como los clínicos indican que los diferentes tipos de glicanos vegetales dietéticos y sus productos metabólicos contribuyen a efectos metabólicos beneficiosos para el huésped¹²⁹. Por ejemplo, la fermentación de celulosa, hemicelulosa, almidón resistente, pectina, lignina o varios oligosacáridos puede conducir a la producción de ácidos grasos de cadena corta como los ácidos acético, propiónico o butírico, que, a su vez, ayudan a regular el metabolismo de la glucosa y los lípidos^{129,130}. La liberación de estos ácidos grasos puede ocurrir durante la digestión en el tracto gastrointestinal superior, pero también puede continuar en el colon¹³¹.

Los estudios sobre la composición del microbioma en adultos se centran principalmente en los impactos resultantes en la salud, mientras que los efectos de los ácidos siálicos en la dieta en este contexto se pasan por alto en gran medida ¹³². Dada la variación en las dietas de las diferentes personas, los efectos de los ácidos siálicos dietéticos en el microbioma intestinal adulto suelen ser difíciles de separar. En consecuencia, los estudios de cohorte que se centran en patrones dietéticos particulares, como el Estudio Adventista de Salud-2 ¹³³ o el estudio EPIC-OXFORD ¹³⁴, son potencialmente útiles para examinar el impacto de los ácidos siálicos de la dieta, tales como Neu5Ac o Neu5Gc, en el microbioma intestinal. Esta información sobre la relación entre los ácidos siálicos de la dieta y el microbioma puede revelar detalles adicionales sobre varias enfermedades no transmisibles, como la diabetes tipo 2 ^{135,136}, trastornos cardiovasculares ^{137,138}, o el cáncer ^{12,139–141}.

Las bacterias pueden liberar ácidos siálicos conjugados o usarlos como fuentes de nutrientes ^{142,143}. Los simbioses del microbioma intestinal, como *el Ruminococcus gnavus*, pueden eliminar el ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) de las mucinas y convertirlo en 2,7-anhidro-Neu5Ac ¹⁴⁴. Sin embargo, el catabolismo del 2,7-anhidro-Neu5Ac no se limita a *R. gnavus*. *Escherichia coli* también puede transportar y catabolizar ácidos siálicos como Neu5Ac, Neu5Gc o KDN para satisfacer sus necesidades de carbono y nitrógeno. Estos ácidos siálicos se transportan a través del transportador NanT y se catabolizan utilizando la aldolasa de ácido siálico NanA ¹⁴⁵. Las glicosilhidrolasas escinden los enlaces glicosídicos de los sustratos *O*-aceptores del ácido siálico a través de una reacción exohidrolítica ¹⁴⁶. Además, el tratamiento de la carne previa a la ingesta a través de sialidasas bacterianas podría liberar el Neu5Gc ^{142,147}, lo que podría ayudar a reducir los efectos inflamatorios en consumidores de carnes rojas ¹³².

1.4. Interacciones con patógenos

Los ácidos siálicos actúan como receptores de diversos patógenos que producen enfermedades infecciosas ¹⁴⁸. Algunos patógenos pueden sintetizar o detener los ácidos siálicos de sus huéspedes e incorporarlos a sus propios glicoconjugados y derivados ¹⁴⁹. Por ejemplo, las bacterias producen adhesinas o toxinas que interactúan con los ácidos siálicos en las células huésped ¹⁴⁷, los virus pueden usar ácidos siálicos para adherirse a las células y entrar en ellas ¹⁵⁰, y los protozoos pueden usar ácidos siálicos para eludir la inmunidad del huésped ^{151–153}.

1.4.1. Ácidos siálicos y bacterias

Algunas especies bacterianas pueden producir Neu5Ac y los glicoconjugados correspondientes. Otros, en cambio, simplemente pueden utilizar los ácidos siálicos como fuentes de carbono. Esta capacidad de utilizar ácidos siálicos parece estar correlacionada con la virulencia bacteriana en una serie de infecciones, especialmente en el entorno profusamente sialilado del intestino ¹⁵⁴. Las bacterias obtienen ácidos siálicos de dos maneras: ya sea a través de la síntesis *de novo* o a partir de vías de barrido que utilizan sialidasas específicas para escindir los ácidos siálicos en glicoconjugados ^{145,155}. Al igual que en los eucariotas, la vía de síntesis *de novo* en las bacterias comienza con la fosforilación de la glucosa por una hexoquinasa ¹⁵⁶.

En *E. coli*, en la vía NeuC, la glucosa se convierte en glucosa-6-fosfato a través de la acción de una hexoquinasa ¹⁵⁷⁻¹⁶¹. A esto le sigue la conversión de glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato por glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI). Cuatro reacciones tienen lugar secuencialmente, facilitadas por tres enzimas: glucosamina-6-fosfato sintasa (glmS), fosfoglucosamina mutasa (glmM) y la enzima bifuncional glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa/N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa (glmU). El resultado de estos pasos de reacción es la formación de UDP-GlcNAc ^{157,162}. La conversión de UDP-GlcNAc a ManNAc es catalizada por la UDP-GlcNAc 2-epimerasa ¹⁶³ y NeuC, que es responsable de la biosíntesis del precursor de N-acetil-D-manosamina, seguida de la conversión catalizada por NeuB de N-acetil-D-manosamina con fosfoenolpiruvato en el producto Neu5Ac ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ (Figura 7) ^{159,162-164,167}. Alternativamente, una vía sintética acortada puede utilizar precursores de sialilo recolectados de huéspedes animales para producir Neu5Ac ¹⁶⁸, particularmente durante la síntesis de la pared celular ¹⁵⁶.

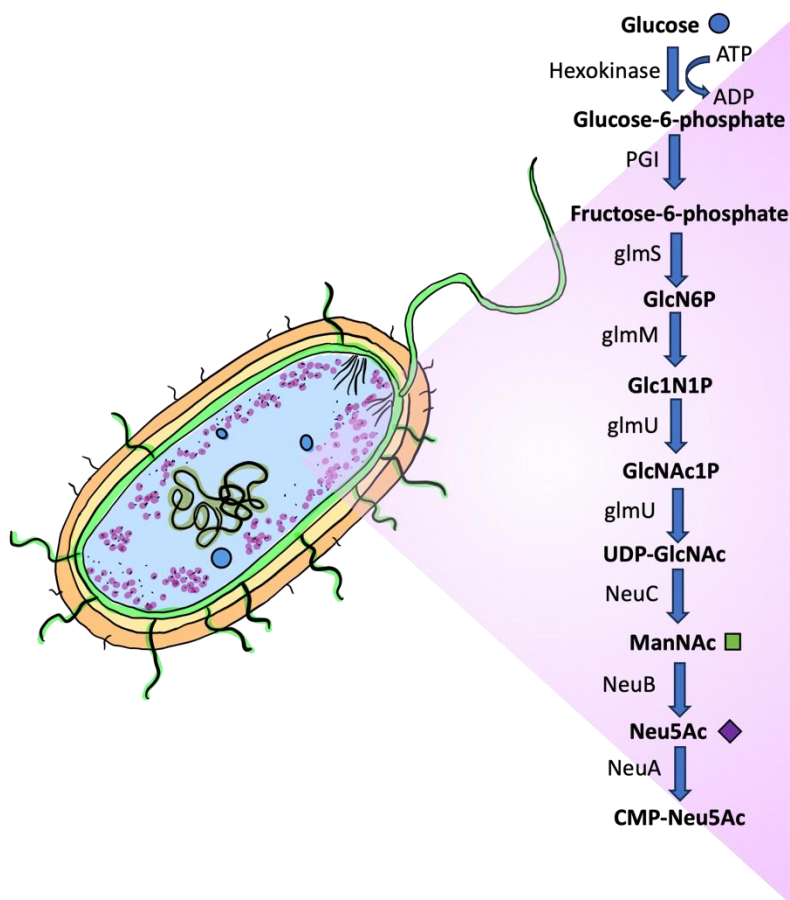


Figura 7. Biosíntesis de ácido N-acetilneuramínico en procariotas. En la bacteria *E. coli*, la glucosa se metaboliza a través de una serie de reacciones enzimáticas. El proceso comienza cuando la glucosa entra en la célula y es fosforilada por la hexoquinasa para formar glucosa-6-fosfato. El siguiente paso implica una reacción de isomerización catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI), que convierte la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato mediante un reordenamiento. La vía avanza a través de varios pasos más, incluida la escisión de la fructosa-6-fosfato, seguida de una serie de cuatro reacciones catalizadas por enzimas para generar un azúcar nucleótido llamado UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). A continuación, UDP-GlcNAc se convierte en ManNAc, catalizado por NeuC (UDP-GlcNAc 2-epimerasa), una epimerasa hidrolizante de UDP-GlcNAc. Neu5Ac se produce a través de una reacción de condensación de ManNAc con piruvato de fosfoenol (PEP), que es catalizado por NeuB (ácido siálico sintasa). El Neu5Ac es cebado por NeuA (ácido siálico O-acetiltransferasa) y CTP para formar CMP-Neu5Ac. CMP: citidina 5'-monofosfato. CTP: trifosfato de citidina; CMP-Neu5Ac: ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico; UDP-GlcNAc: difosfato de uridina N-acetilglucosamina. Extraído de: Guerrero-Flores, G.N., et al. (2025). Sialic Acids in Health and Disease.

Algunas bacterias pueden ser capaces de sintetizar NulOs adicionales estructuralmente relacionados. Tales NulOs bacterianos incluyen ácido legionamínico ¹⁴⁷, ácido pseudodamínico ^{169,170}, ácido fusamínico ¹⁷¹, y ácido acinetamínico ¹⁷². En este contexto, la convención de

nomenclatura suele seguir a un nombre derivado de la especie microbiana reportada por primera vez como su productora ¹⁶⁹. Por ejemplo, el ácido legionamínico se observó por primera vez en *Legionella pneumophila*, conocida por la infección respiratoria enfermedad del legionario ¹⁷³. De manera similar, el ácido acinetamínico se identificó por primera vez en el patógeno multirresistente *Acinetobacter baumannii* ^{143,174}.

1.4.2. *Porphyromonas gingivalis*

La periodontitis es una de las enfermedades bucodentales más prevalentes ¹⁷⁵; se caracteriza por un daño gradual del ligamento periodontal y los tejidos circundantes, que potencialmente puede incluir hueso alveolar, con pérdida final de dientes ¹⁷⁶. Estas condiciones se asocian característicamente con malos hábitos de cepillado y desuso de hilo dental, lo que permite la colonización polimicrobiana en las superficies de los dientes, en forma de una biopelícula pegajosa ¹⁷⁷. *Porphyromonas gingivalis* sirve como un patógeno clave en la comunidad microbiana, responsable de la aparición y progresión de la periodontitis ^{178–180}.

La supervivencia de *P. gingivalis* junto a la mucosa oral depende de su interfaz dinámica y de su membrana celular ¹⁸¹, lo que facilita la liberación de desechos y la adquisición de nutrientes. Una vez adherido a la cavidad bucal, *P. gingivalis* utiliza los aminoácidos del huésped y otras moléculas que contienen carbono como fuentes de energía y como materiales de construcción para sus funciones y crecimiento ^{182,183}. Curiosamente, este patógeno gramnegativo, aunque se ha descrito durante mucho tiempo como asacarolítico, puede utilizar azúcares como la glucosa para la biosíntesis de otras macromoléculas intracelulares ¹⁸⁴. La membrana celular de *P. gingivalis* también contribuye a la colonización eficaz de los tejidos ¹⁸¹, liberando vesículas con un arsenal de factores de virulencia, incluidos lipopolisacáridos (LPS), fimbrias, gingipaínas y otros ^{185,186}. El sistema inmunitario del huésped responde a ellas aumentando la producción y liberación de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y la interleucina (IL)-1 β ¹⁸⁷. La interacción entre los microorganismos destructivos y las respuestas inmunitarias proinflamatorias provoca la degradación del tejido periodontal ^{181,188}.

Además, *P. gingivalis* es capaz de producir y liberar sialidasas, que también pueden servir como factores de virulencia ¹⁴⁶. La infección puede ser sostenida por la acción de las sialidasas y sialopeptidasas (la *O*-sialoglicoproteasa) hidroliza el sustrato aceptor del ácido siálico a través

de una reacción endohidrolítica, escindiendo los ácidos siálicos de las glicoproteínas del huésped¹⁴⁶ y contribuyendo a la progresión de la enfermedad¹⁸⁰. De manera similar, la virulencia de *P. gingivalis* puede aumentar aún más si las sialidasas también regulan la actividad de las gingipainas (cisteína proteasas)^{146,189}. Por el contrario, la inhibición de las sialidasas de *P. gingivalis* puede ser estratégicamente útil en el tratamiento de la periodontitis¹⁸⁰.

1.4.3. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, comúnmente conocido como neumococo, es un patógeno oportunista extracelular grampositivo adaptado al tracto respiratorio superior humano¹⁹⁰. Esta bacteria es especialmente predominante en niños en edad preescolar y aquellos que asisten a guarderías^{190,191}. *S. pneumoniae* es responsable de un espectro de enfermedades, que van desde infecciones leves del tracto respiratorio, como sinusitis u otitis media, hasta afecciones graves, como neumonía, septicemia o meningitis^{172,173,175}. Las infecciones neumocócicas representan una amenaza significativa para la salud mundial. A nivel mundial, se ha estimado que las muertes atribuidas a la enfermedad neumocócica entre los niños menores de cinco años alcanzan entre 1,8 y 2,0 millones, causando alrededor del 11% de todas las muertes en este grupo de edad¹⁹¹⁻¹⁹⁴.

La fuente principal de propagación de *S. pneumoniae* está mediada por la transmisión desde la vía aérea nasofaríngea del huésped¹⁹⁴. Al entrar en la nasofaringe humana, *S. pneumoniae* se encuentra con moco, que es rico en glicoconjugados como las mucinas, ricas en GlcNAc, N-acetilgalactosamina (GalNAc), galactosa y residuos terminales de ácido siálico, particularmente, Neu5Ac^{193,195}. Estos azúcares son degradados por la maquinaria metabólica específica de glicanos de *S. pneumoniae*¹⁹⁵, un proceso que incluye la eliminación de los ácidos siálicos terminales, que también sirven como fuentes de carbono para las bacterias^{195,196}.

S. pneumoniae expresa hasta tres sialidasas, incluyendo SpNanA, SpNanB y/o SpNanC¹⁹². SpNanA, junto con SpNanB, proporciona una fuente de ácidos siálicos al patógeno y favorece la infección, nutrición, colonización y formación de biopelículas del huésped^{192,197,198}. SpNanC sirve como regulador de las sialidasas hidrolíticas, como SpNanA, catalizando la producción del inhibidor de la sialidasa Neu5Ac2en^{192,199}. Se considera que el SpNanC es un marcador potencial del síndrome urémico hemolítico neumocócico en niños¹⁹², ya que su actividad está ligada al desarrollo de esta grave complicación^{192,200}.

Los estudios continuos de estas sialidasas y sus relaciones estructura-función tienen el potencial de producir nuevos enfoques sobre las infecciones bacterianas ^{179,183,184,186}. El desarrollo de inhibidores selectivos contra las sialidasas abre nuevas perspectivas para el tratamiento *de S. pneumoniae* ¹⁹².

1.4.4. *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae es un patógeno humano adaptado a su huésped ^{168,201}. Se clasifica en cepas tipificables, que producen una cápsula de polisacáridos (serotipos a-f), y cepas no tipificables y no encapsuladas de *H. influenzae* (NTHi) ^{202,203}. Los seres humanos sanos pueden ser portadores asintomáticos *de H. influenzae* en el tracto respiratorio superior ²⁰⁴. Las cepas típicas *de H. influenzae* se asocian con formas invasivas de infección, como sepsis o meningitis ²⁰⁵. Por el contrario, las cepas de NTHi suelen ser responsables de la inflamación asociada a las vías respiratorias, como la sinusitis, la conjuntivitis, la faringitis, la otitis media y la neumonía, además de posibles bacteriemias y meningitis ²⁰⁶. La NTHi invasiva, que representa entre el 43 y el 91% de los aislados invasivos, está aumentando en varios países, entre ellos Canadá, Países Bajos, Portugal, Eslovenia y Suecia ²⁰⁷. La NTHi tiende a causar enfermedad invasiva grave en neonatos y en niños, con comorbilidades significativas ^{206,208,209}. Aproximadamente el 10% de los niños de 2 a 4 años de edad ²¹⁰, y el 17% de los niños en su primer año sucumben a infecciones mortales por NTHi ²⁰⁹⁻²¹¹. El aumento de la incidencia de NTHi invasiva se debe a varios factores, entre ellos una mayor vulnerabilidad de algunos pacientes ^{207,210}.

1.4.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gramnegativa de vida libre, móvil y aeróbica ²¹². Es un patógeno infeccioso oportunista, generalmente asociado con infecciones nosocomiales, quemaduras graves, fibrosis quística crónica, cáncer, SIDA, trasplantes y otras afecciones inmunosuprimidas ^{202,204,205}.

P. aeruginosa carece de la vía sintética del ácido siálico *de novo*. Sin embargo, puede absorber monosacáridos de fuentes exógenas, incluido el Neu5Gc ²¹³. Cuando los ácidos siálicos son incorporados por *P. aeruginosa*, se reduce la deposición del complemento C3b en la superficie de la célula bacteriana ²¹³. Además, *P. aeruginosa sialilada* tiene afinidad por los receptores CD33 humanos, incluidos los receptores de superficie de las células inmunitarias Siglecs 7 y 9, lo cual, es una característica compartida con otras bacterias sialiladas ²¹⁴⁻²¹⁶.

1.4.6. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens es el principal patógeno en las infecciones intestinales e histotóxicas, produciendo afecciones como gangrena gaseosa y mionecrosis clostridial.^{217,218} *C. perfringens* también se asocia frecuentemente con casos de intoxicación alimentaria²¹⁹. Se sabe que *C. perfringens* es capaz de utilizar ácidos siálicos como fuentes de carbono^{220,221}. Además de una variedad de toxinas²²², esta bacteria anaeróbica grampositiva también produce una serie de sialidasas. De estos, NanH tiene una ubicación citoplasmática durante la fase de crecimiento logarítmico del cultivo. Por el contrario, NanJ y NanI son exosialidasas secretadas^{220,222,223}. La mayoría de las cepas de *C. perfringens* producen las tres sialidasas. Sin embargo, algunas cepas de *C. perfringens* producen solo uno o dos de ellos. En el caso de las cepas que producen los tres, el NanI suele ser responsable del 70% de la actividad total de la exosialidasa²²³. Cuando está presente, NanI mejora la colonización de *C. perfringens* en el tracto intestinal²¹⁷ y aumenta la actividad citotóxica y la interacción de varias toxinas con las células huésped²²⁴.

1.4.7. *Neisseria gonorrhoeae*

La gonorrea plantea un importante desafío para la salud mundial, debido al aumento de las tasas de infección, la aparición de resistencia a los antibióticos y la evasión de las respuestas inmunitarias defensivas^{225–227}. Sin embargo, los mecanismos exactos de las interrupciones de las respuestas inmunitarias del huésped mediadas por *N. gonorrhoeae* no se conocen bien. Se sabe, sin embargo, que la sialiltransferasa de *N. gonorrhoeae* se adhiere a los ácidos siálicos, extraídos del huésped, a su propio lipooligosacárido de superficie abundante²²⁷. La longitud y composición de estos glicolípidos están reguladas por genes que codifican las glicosiltransferasas de los lipooligosacáridos²²⁸. La expresión de estos genes constituye un mecanismo primario de adaptación bacteriana a entornos desafiantes al alterar su composición de oligosacáridos superficiales^{227–229}. *N. gonorrhoeae*, aislada de la infección uretral, produce predominantemente lipooligosacáridos, que pueden ser sialilados por sialiltransferasas para una infección óptima del tracto genital^{230,231}. En este contexto, el ácido CMP-siálico del huésped puede ser utilizado por las sialiltransferasas de *N. gonorrhoeae* para unir el ácido siálico a sus propios grupos hidroxilo aceptores²²⁷. Muchos aspectos del mecanismo de virulencia de *N. gonorrhoeae* y su asociación con los ácidos siálicos aún no se han resuelto.

1.5. Ácidos siálicos e interacciones virales

El paso inicial en el ciclo de vida viral es la unión de las partículas del virus a la superficie celular ^{150,232}. Esta adherencia se ve facilitada por la interacción del virus con un receptor específico ^{2,151}. Las moléculas receptoras son componentes integrales de la membrana celular. El determinante del receptor, que sirve como sitio de unión para el virus, puede consistir en un epítipo de proteína o en la molécula de carbohidratos de una glicoproteína o un glicolípido ¹⁵⁰. Las proteínas solubles en los fluidos corporales y el moco en los epitelios respiratorios y entéricos también pueden contener carbohidratos e interferir con la unión del virus a la superficie celular ²³³. La unión se logra mediante la unión del virus a un receptor de la superficie celular, y las interacciones suelen ser electrostáticas. A veces, los correceptores también están involucrados, lo que podría promover eventos posteriores al apego en el proceso de entrada. El contacto temprano entre la proteína de unión viral y un receptor es débil y reversible. Sin embargo, a medida que múltiples proteínas de unión viral interactúan con múltiples moléculas receptoras, la unión se vuelve más fuerte e irreversible ²³⁴. Por lo tanto, las células con una mayor densidad o un mayor número de receptores se infectan más fácilmente ²³⁵.

1.5.1. Virus de la influenza

Como miembros de *Orthomyxoviridae*, los virus de la influenza están envueltos con ARN segmentados, monocatenarios y de sentido negativo empaquetados como ribonucleoproteínas en viriones ^{205,236}. En función de la diversidad antigénica de las proteínas del virión, como la proteína de la matriz y la proteína de la nucleocápside, los virus de la gripe se clasifican en tres géneros: A, B y C ^{237,238}. La clasificación adicional se basa en las glicoproteínas hemaglutinina y sialidasa expresadas en la envoltura viral de los virus de la influenza A y B ²³⁸. Los virus de la influenza aviar A muestran una fuerte afinidad por el ácido siálico ligado a $\alpha 2,3$ como receptor ^{203,238,238,239}. Como resultado, los virus aviares tienden a unirse a Neu5Ac cuando se unen a la galactosa mediante un enlace $\alpha 2,3$, mientras que los virus humanos se unen en gran medida a Neu5Ac, unida a la galactosa a través de un enlace $\alpha 2,6$ ²³⁹⁻²⁴¹.

Los brotes pandémicos, generalmente caracterizados por epidemias estacionales anuales, involucran cepas del virus de la influenza A de origen zoonótico ²⁴². La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las epidemias anuales de gripe provocan aproximadamente 1.000 millones de infecciones, entre 3 y 5 millones de casos de enfermedad grave y entre 300.000 y

500.000 muertes²⁴³. Aproximadamente el 10% de la población mundial se ve afectada por la gripe anualmente, lo que provoca aproximadamente medio millón de muertes al año²³⁶.

Los virus de la influenza ingresan a las células a través de la endocitosis, tanto por vías independientes como dependientes de clatrina²⁴⁴. La bicapa de fosfolípidos virales, que se origina en la membrana del huésped, incluye hemaglutinina, que se expresa en forma de espigas en la superficie del virión^{245,246}. A través de la vía de endocitosis dependiente de clatrina, la hemaglutinina se une a los ácidos siálicos de las glicoproteínas de la superficie de la célula huésped o glicolípidos, y media la fusión de la membrana virus-huésped^{245,247-249}. Sin embargo, también se pueden emplear vías endocíticas alternativas, como la macropinocitosis^{244,250,251}.

Además, las sialidasas también se insertan en la bicapa de fosfolípidos virales en forma de espigas^{245,246}. Estas sialidasas son de crucial importancia durante la invasión viral del epitelio ciliado en las vías respiratorias humanas²⁵², específicamente, en la eliminación de receptores señuelo en mucinas, cilios y glicocálix celular^{245,253}. Además, la sialidasa contribuye a la patogenicidad de la gripe a través de varios mecanismos adicionales, todos ellos derivados de su capacidad para romper el enlace α -cetósídico entre el ácido siálico terminal y el residuo de azúcar adyacente²⁵⁴. En particular, la sialidasa facilita la liberación de ácido siálico, que puede servir como fuente de carbono para las bacterias²⁵⁵, explicando la frecuente sobreinfección por bacterias tras la infección viral por gripe^{247,256}.

Se prevé que en un futuro próximo se introducirán vacunas contra la gripe que se dirijan simultáneamente a la hemaglutinina viral y a la sialidasa viral²⁵⁷.

1.5.2. SARS-CoV-2

En respuesta a la rápida propagación mundial de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró una emergencia de salud pública de interés internacional el 30 de enero de 2020²⁵⁸. Esta enfermedad infecciosa conocida como síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (SARS-CoV-2) es causada por el coronavirus 2 y ha provocado muchas muertes en todo el mundo. Hasta el 31 de octubre de 2020, se habían notificado más de 45 millones de casos confirmados de COVID-19 y 1,2 millones de muertes en todo el mundo²⁵⁹. Si bien todos los coronavirus infectan las vías respiratorias, el SARS-CoV-2

también daña otros órganos, como el corazón, el tracto gastrointestinal, el hígado, los riñones y el sistema nervioso central. Lo que potencialmente podría conducir a una falla multiorgánica ^{260,261}.

La partícula del virus SARS-CoV-2 es un virus de ARN esférico con envoltura que contiene un genoma monocatenario. La envoltura viral tiene un diámetro promedio entre 65 y 97 nanómetros ²⁶⁰. Al igual que otros coronavirus, el SARS-CoV-2 contiene trímeros de proteína S que sobresalen de su envoltura. La proteína S está formada por 1273 aminoácidos que comprenden dos subunidades, S1 y S2. La unión de la subunidad S1 a los receptores de la célula huésped media la entrada viral y la infección. La subunidad S1 contiene dos dominios distintos: un dominio N-terminal y un dominio C-terminal ^{262,263}. El dominio de unión a glicanos ubicado en el dominio N-terminal interactúa con glicolípidos y glicoproteínas en la superficie de la célula huésped ²⁶⁴. El dominio C-terminal contiene el dominio de unión al receptor que se une al receptor ACE2, el principal punto de entrada para el SARS-CoV-2 y otros coronavirus ²⁶⁵.

Se sabe que algunos coronavirus se unen a los ácidos siálicos, y la infección por SARS-CoV también podría implicar interacciones con el ácido siálico ^{266,267}. Las predicciones computacionales, los estudios de modelado y los análisis microscópicos indican que el SARS-CoV-2 puede unirse a los ácidos siálicos ^{268,269}. Esta capacidad de unión puede explicar la transmisibilidad extremadamente alta del SARS-CoV-2, en comparación con otros coronavirus humanos ^{266,270}. Aunque las nanopartículas de oro conjugadas con ácidos siálicos tienen una alta avidez por la proteína S1 del SARS-CoV-2 (que contiene tanto el dominio N-terminal como el dominio de unión al receptor), su unión a las moléculas modelo sialiladas parece ser relativamente débil ^{271,272}. Mientras que numerosos informes y revisiones ^{273,274} discuten el papel potencial de los ácidos siálicos como correceptores para el SARS-CoV-2, la estructura específica de sialilo a la que se dirige la proteína de espícula sigue sin estar clara ²⁷⁵. Se sabe que el dominio de unión al receptor de la proteína de la espícula del SARS-CoV-2 se une a los oligosacáridos que contienen ácidos siálicos. No obstante, las interacciones preferenciales parecen ser con los lípidos que permiten que el virus ingrese a las células huésped ²⁷². Además, la unión directa entre oligosacáridos que contienen ácido siálico (α 2,3 y α 2,6 sialil *N*-acetilactosamina) y el dominio N-terminal de la glicoproteína de la espícula del SARS-CoV-2 se ha verificado mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear por diferencia de transferencia de saturación ²⁷⁶. Sin embargo, la relevancia de esta interacción para la entrada celular aún debe confirmarse. Se

necesita más trabajo para comprender mejor el mecanismo de infección y la propagación del SARS-CoV-2.

1.6. Ácidos siálicos y hongos

Los hongos son degradadores eficaces de la materia orgánica muerta ²⁷⁷, y pueden afectar el ecosistema humano ^{20,278}. Ocasionalmente, los hongos pueden volverse patógenos, explotando el tejido vivo del huésped para sobrevivir, lo que lleva al desarrollo de enfermedades ²⁷⁹. Sin embargo, antes de que eso pueda suceder, las células fúngicas deben resistir de alguna manera las defensas del sistema inmunológico humano. Por lo tanto, las infecciones fúngicas tienden a ocurrir en personas inmunodeprimidas. A pesar de esto, los hongos con cápsulas de polisacáridos tienden a ser más infecciosos.

1.6.1. *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans se utiliza como organismo modelo que ilustra cómo los ácidos siálicos podrían contribuir a la evasión de la respuesta inmunitaria humana ^{20,280}. Este hongo patógeno tiene una verdadera cápsula de polisacárido en el exterior de su pared celular ²⁸¹, sirviendo como su principal factor de virulencia ^{280,282}. La protección del sistema inmunitario se ve favorecida por los ácidos siálicos y sus derivados 9-*O*-acetilados, que forman parte de los polisacáridos capsulares fúngicos ^{20,283}. Estos ácidos siálicos parecen reducir la probabilidad de fagocitosis por parte de los macrófagos alveolares durante las etapas iniciales de la infección, ya que las basidiosporas se inhalan y entran en los espacios alveolares ^{281,284}.

1.6.2. *Histoplasma capsulatum*

La infección por *Histoplasma capsulatum* provoca una importante morbilidad y mortalidad a nivel mundial ²⁸⁵. Como ascomiceto dimórfico, este hongo crece en forma de hifa en el suelo y en los excrementos de aves y murciélagos ²⁸⁶. Al entrar en el huésped, en forma de microconidios o fragmentos de hifas, *el H. capsulatum* viaja a través del sistema respiratorio dentro de los fagocitos hasta llegar a los alvéolos ²⁸⁷. Allí, la levadura, dentro o fuera de los fagocitos del huésped, se torna en la forma patógena, produciendo histoplasmosis ^{287,288}. Al invadir el sistema respiratorio del huésped, la levadura debe evadir las defensas inmunomediadas e intracelulares ²⁸⁹. Mientras tanto, estas células de levadura necesitan sobrevivir o evadir el entorno antimicrobiano hostil dentro de los fagocitos ^{290,291}, incluida la posible exposición al oxígeno reactivo, como el peróxido de hidrógeno, y a las especies reactivas de nitrógeno ^{290,292}. Las células de levadura inhiben

activamente la fusión fago-lisosomal, evitando así la exposición a las enzimas hidrolíticas ácidas de los lisosomas^{287,293}. Además, *H. capsulatum* impide la acumulación de ATPasa vacuolar, que normalmente es necesaria para la acumulación de protones en los fagosomas, lo que permite al hongo alcalinizar el pH fagosomal a 6,5^{290,292,293}. Si se encuentra un ambiente adecuado para el crecimiento y la reproducción, la levadura también puede diseminarse y desarrollar granulomas²⁸⁸. Posteriormente, el patógeno se disemina a los ganglios linfáticos y luego a varios órganos, gracias a los fagocitos que funcionan como sus transportadores^{287,289,294}.

1.6.3. *Candida albicans*

Candida albicans suele colonizar la piel, la cavidad orofaríngea, el sistema gastrointestinal y el tracto vaginal²⁹⁵. Las infecciones por especies de *Candida* están muy extendidas y son cada vez más frecuentes²⁹⁵⁻²⁹⁷, especialmente durante la infancia o en la vejez^{298,299}. Una amplia gama de condiciones, que abarcan factores ambientales, locales y sistémicos, así como predisposiciones hereditarias, pueden alterar el estado normalmente latente del *Candida*^{295,299,300}. Los signos y síntomas pueden corresponder a una variedad de morbilidades, desde trastornos mucocutáneos superficiales localizados hasta enfermedades invasivas que involucran múltiples sistemas de órganos²⁹⁵. La transición en la fisiopatología desde el inicio hasta la progresión de la infección también está influenciada por los rasgos particulares de virulencia que finalmente conducen al desarrollo de la candidiasis^{295,301}.

Tres tipos de monosacáridos forman cadenas de carbohidratos, o glicanos, dentro de la pared celular de *Candida*: D-Glc, GlcNAc, y D-Man³⁰². Varios informes documentan los ácidos siálicos como constituyentes de la pared celular de la *Candida*^{20,303,304}. Los ácidos siálicos contribuyen a la carga negativa de las células fúngicas y tienen un papel en su interacción específica con el tejido del huésped, incluido un papel potencial en la patogenicidad³⁰³. Aunque varios microorganismos que infectan a animales o humanos producen sialidasas para su adhesión o invasión, *C. albicans* no lo hace, lo que implica que es probable que la sialidasa fúngica no tenga relevancia en la candidiasis cutánea o mucosa³⁰⁵. En consecuencia, esto entraña que los ácidos siálicos son probablemente adquiridos por *C. albicans* del entorno del huésped a través de las sialiltransferasas. Se necesitan más investigaciones sobre el papel de la sialilación superficial de *C. albicans*, particularmente en lo que se refiere a la infectividad de este organismo.

1.7. Ácidos siálicos y parásitos

Los parásitos contribuyen significativamente a las enfermedades humanas en todo el mundo, particularmente en los países menos desarrollados. La gravedad clínica y los resultados de las enfermedades parasitarias a menudo se ven fuertemente afectados por el estado inmunológico del huésped ³⁰⁶. Por ejemplo, los helmintos tienden a provocar una respuesta protectora del huésped de linfocitos T tipo 2, con producción de IgE, eosinofilia y mastocitosis ³⁰⁷, mientras que los protozoos inducen una respuesta inmunitaria humoral y/o celular que no suele asociarse a la eosinofilia ³⁰⁸. Para superar las defensas inmunitarias, los parásitos emplean una variedad de mecanismos. Estos pueden incluir (a) volverse "invisibles" para el sistema inmunológico al invadir órganos o células inmunoprivilegiados, como el sistema nervioso central, los ojos o las células sanguíneas, o (b) decorar los glicoconjugados de su superficie con ácidos siálicos, que pueden sintetizarse directamente o apropiarse del huésped ³⁰⁹. En consecuencia, las células T y los anticuerpos del sistema inmunitario del vertebrado no pueden acceder al parásito o no reconocen fácilmente las superficies antigénicas específicas del parásito para su detección ³¹⁰, ataque y posterior eliminación efectivos. Estos mecanismos evasivos son cruciales para la supervivencia del parásito dentro del huésped ¹⁴⁹.

1.7.1. *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito protozoario causante de la enfermedad de Chagas ³¹¹. En América Latina, casi el 30% de las personas infectadas crónicamente con enfermedad de Chagas manifiestan una respuesta sistémica intensa que frecuentemente se asocia con daño a órganos esenciales, como el corazón o el tracto gastrointestinal. Esto sugiere que una amplia gama de interacciones huésped-parásito afectan el curso de la infección ^{153,312}.

El parásito protozoario es transportado por un insecto triatómino ³¹³. Después de que el insecto infectado se alimenta de sangre, los tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* se descargan a través de las heces o la orina del insecto. Luego, los tripomastigotes pueden infectar al huésped mamífero penetrando en la mucosa o a través de regiones discontinuas en el epitelio. Una vez dentro del huésped, el parásito protozoario infecta rápidamente una variedad de células de mamíferos nucleadas. La unión e invasión de las células huésped, y la formación de las vacuolas parasitóforas con *T. cruzi*, involucra una colección de proteínas de superficie ancladas a glicosilfosfatidilinositol polimórficas, incluidas las mucinas y las trans-sialidasas ³¹⁴. Usando su arsenal, el parásito

desestabiliza tanto la inmunidad innata como la adaptativa del huésped ^{315,316}. Aunque no puede sintetizar ácidos siálicos *de novo*, *T. cruzi* utiliza una enzima transialidasa única que escinde los residuos terminales de ácido siálico de los glicoconjugados de la superficie de la célula huésped y los transfiere a las mucinas de la superficie del parásito, generando una cubierta protectora/adhesiva ³¹⁷. La sialilación de las mucinas derivadas de parásitos tiene efectos inhibidores sobre las células T CD4 ³¹⁶, induciendo la supresión de sus respuestas. Además, *T. cruzi* libera transialidasa a la circulación, como un mecanismo de modificación de la firma de ácido siálico superficial del huésped, explotando las propiedades funcionales y de señalización de las células objetivo del huésped de mamíferos ²². Después de que los lisosomas se fusionan con las vacuolas parasitóforas, una red compleja de enzimas antioxidantes, incluida la superóxido dismutasa, protege al microorganismo de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno ³¹⁸. La acidificación asociada con el contenido lisosomal activa ciertos pasos críticos que permiten al parásito escapar del fagosoma al citoplasma, donde se diferencia en la forma amastigota replicativa. Después de numerosas duplicaciones y rupturas de la membrana de la célula huésped, los amastigotes se diferencian en tripomastigotes infecciosos que son capaces de infectar las células adyacentes y ser transportados por ellas a áreas distantes a través de la circulación ^{318,319}. Según los estudios de detección, la ciprofloxacina se une a las transialidasas, que son esenciales para la supervivencia de *T. cruzi* ³²⁰. Esto sugiere que los efectos antiparasitarios de las quinolonas son, al menos en parte, causados por la inhibición de la transialidasa ³²¹.

1.7.2. *Plasmodium* spp.

La malaria puede ser causada por varias especies de *Plasmodium* ³²². Según el último Informe Mundial sobre el Paludismo, en 2023 se registraron 263 millones de casos, lo que supone un ligero aumento con respecto a los 252 millones de casos del año anterior. En 2023, se estimó que las muertes relacionadas con el paludismo ascendieron a 597.000 ³²³. El aumento de los casos de paludismo se atribuye principalmente a: a) el desarrollo de resistencia del parásito a los medicamentos antipalúdicos y b) el rápido crecimiento de la población en las regiones más gravemente afectadas ^{322,324,325}.

La infección se inicia durante una ingesta de sangre por un mosquito *Anopheles* infectado, cuando, junto con la saliva del anticoagulante, se inyectan entre aproximadamente 10 y 100 esporozoítos en la circulación del huésped ^{326,327}. Los parásitos invaden los hepatocitos en el

hígado ³²⁸, donde experimentan su primer ciclo de replicación, produciendo miles de merozoítos. Estos merozoítos se liberan en el torrente sanguíneo ³²⁹, donde infectan los eritrocitos. El parásito se encierra dentro de una membrana vacuolar parasitófora y comienza a remodelar la célula huésped ³³⁰. Estos procesos conllevan alteraciones tanto internas como externas que facilitan la supervivencia y proliferación del parásito dentro del glóbulo rojo ³³¹. Durante la etapa de la sangre, los parásitos se replican asexualmente, madurando en esquizontes que se someten a múltiples rondas de división nuclear para producir merozoítos ^{329,332}. Dado que los glóbulos rojos no son el objetivo de las células citotóxicas, el parásito está protegido del sistema inmunitario ^{329,333}. Mientras digiere la hemoglobina del huésped y se replica dentro del glóbulo rojo, el parásito se expande y modifica la membrana de los glóbulos rojos ^{152,329,333}. Los glóbulos rojos infectados por *P. falciparum* se vuelven más rígidos, mientras que los infectados por *P. vivax* se vuelven más flexibles ³²⁷. En esta etapa, una fracción de los parásitos se diferencia en gametocitos sexualmente competentes, que luego pueden transmitirse a través del mosquito vector ³³⁴.

El patógeno de la malaria tiene una selectividad relativamente alta para su respectivo huésped ³³⁵. De las cinco especies de *Plasmodium* que infectan a los humanos, *P. falciparum* y *P. vivax* son, con mucho, las más comunes y letales ³³⁶. Ambos dependen de los ácidos siálicos para el establecimiento de infecciones, la invasión de glóbulos rojos y la evasión del sistema inmunológico ^{329,332,337,338}. Sin embargo, la invasión de reticulocitos por *P. vivax* depende principalmente del antígeno/receptor de Duffy del reticulocito para las quimiocinas (DARC) ³³⁹. *P. falciparum*, por otro lado, emplea una dependencia más directa y crítica de los residuos de ácido siálico de los eritrocitos, mediada en parte por dos ligandos distintos de proteínas de unión al ácido siálico, expresados en la superficie del parásito y utilizados durante la invasión de glóbulos rojos. Estos son: (a) antígeno protector rico en cisteína (PfCyRPA) ³⁴⁰ y (b) antígeno 175 (EBA-175) ^{341,342}. El receptor de superficie de merozoíto EBA175 se une a los residuos de ácido siálico de la glicoforina A de los eritrocitos ^{152,337}. La actividad de unión de EBA175 se restringe principalmente a la región II de la proteína. En consecuencia, se cree que este dominio presenta un objetivo potencial para el desarrollo de una vacuna contra la malaria ³⁴³. La expresión de diferentes formas de proteínas EBA y Rh en aislados de parásitos de campo, incluidos EBA175, EBA140, EBA181, Rh1 y Rh2, hace que estos esfuerzos sean más desafiantes. Por lo tanto, es probable que no sea suficiente dirigirse a EBA175 solo con una vacuna contra *P. falciparum*. El desarrollo de

una vacuna multivalente, que incorpore varias proteínas clave en la etapa sanguínea, debería ser más prometedor ³⁴³.

1.8. Análisis de ácidos siálicos y enfermedades

Los enfoques analíticos para caracterizar los ácidos siálicos incluyen técnicas de separación, como la cromatografía ³⁴⁴, electroforesis capilar ³⁴⁵, métodos de detección como la colorimetría ³⁴⁶ y la espectrofotometría ³⁴⁷. La colorimetría y la electroforesis capilar son relativamente sencillas de operar, pero tienden a tener una menor sensibilidad y especificidad en comparación con otros métodos ³⁴⁸. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se usa comúnmente para la separación de ácido siálico ^{348,349} y generalmente se combina con detectores de luz ultravioleta ³⁵⁰ o de fluorescencia ^{351,352}. En la actualidad, el estudio de los ácidos siálicos se ve facilitado en gran medida por la aplicación de técnicas de espectrometría de masas para la detección y cuantificación específicas ^{353–357}.

La espectrometría de masas puede proporcionar información cualitativa (estructural) y cuantitativa (masa o concentración molecular) sobre moléculas específicas de interés ³⁵⁸. Los espectrómetros de masas constan de cuatro componentes principales ^{359,360}: (1) una fuente de iones, que permite la ionización de las moléculas de la muestra; (2) un analizador de masas, que separa los iones de acuerdo con su relación masa-carga (m/z); (3) un detector, que mide las abundancias de iones separadas en forma de señales eléctricas, y (4) un dispositivo de registro, que transforma la señal del detector en un formato adecuado para su posterior análisis y procesamiento. El proceso en sí se desarrolla en sus respectivas etapas: (a) La vaporización e ionización de la muestra ^{361,362}. Se pueden utilizar varios enfoques para la ionización en la fase gaseosa, incluidos la ionización de electrones, la ionización química, la ionización por electrospray (ESI), la fotoionización, el plasma acoplado inductivamente y la ionización por desorción láser asistida por matriz ³⁶³. (b) Aceleración de iones a través de un campo eléctrico para alcanzar la misma energía cinética ³⁶⁴. (c) Separación y clasificación de iones según sus relaciones m/z específicas ^{358,365}. (d) Fragmentación de iones para generar fragmentos, cuya distribución es característica de cada molécula. Por lo general, esto se logra en espectrometría de masas en tándem y (e) Detección y registro de iones, en función de la abundancia de iones y la intensidad relativa ^{361,363}.

Las ventajas técnicas de la espectrometría de masas incluyen alta sensibilidad, selectividad específica y requisitos de muestras pequeñas ^{353,366}. En consecuencia, la espectrometría de masas se ha convertido en el enfoque preferido para la investigación de los ácidos siálicos ³⁶⁷. Como resultado de los continuos avances, ahora se están estudiando diversos ácidos siálicos y otros carbohidratos asociados en una variedad de organismos y tejidos humanos, mientras que también se están investigando sus posibles funciones en la salud y la enfermedad humanas.

1.8.1. Procesos inflamatorios

El importante papel de los ácidos siálicos en la afectación de los procesos fisiológicos y patológicos del huésped incluye, como se ha visto, la transferencia de información a través de la interacción célula-célula ^{9,13,24}, la mediación de infecciones bacterianas y virales ^{9,13,24}; pero también incluye la participación en procesos inflamatorios, incluyendo las enfermedades cardiovasculares ^{9,13,24}, el crecimiento tumoral y la metástasis ^{9,13,24}. Es así como varias condiciones patológicas se asocian característicamente con cambios estructurales y funcionales en la expresión de los ácidos siálicos ⁴¹.

Tales alteraciones en los glicanos sialilados pueden detectarse fácilmente en secciones histológicas utilizando lectinas vegetales o anticuerpos antiglicanos ³⁶⁸. El aumento de los niveles de ácido siálico total y libre en casi cualquier afección grave o proceso inflamatorio es coherente con su posible papel como marcadores de trastornos inflamatorios ^{36,367,369,370}. Si bien la justificación que respalda el valor pronóstico de los ácidos siálicos en condiciones patológicas no está clara, se han propuesto algunas posibles explicaciones. Estos incluyen (a) la activación de la síntesis y secreción de proteínas de fase aguda basadas en hepatocitos, incluidas varias sialoglicoproteínas, (b) deterioro de la integridad de la membrana debido al daño celular y (c) actividades reguladas al alza de sialidasas y sialiltransferasas ³⁷⁰. Estas circunstancias podrían conducir a cambios medibles en los niveles de ácido siálico o en los patrones de sialilación, correlacionándose con la progresión de la enfermedad; pero esto no ha sido suficientemente estudiado.

1.8.2. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), con sus factores de riesgo conductuales, ambientales, cardiometabólicos y sociales, representan la principal causa de morbilidad y

mortalidad prematura a nivel mundial en los países occidentales desarrollados ³⁷¹. Algunos de los factores de riesgo que podrían modificarse para ayudar a prevenir o reducir las ECV incluyen la falta de actividad física adecuada, un estilo de vida sedentario, hiperlipidemia, obesidad, hipertensión, diabetes y tabaquismo ³⁷².

Las paredes arteriales comprenden varios tipos de células y una matriz extracelular especializada, todas las cuales proporcionan elasticidad y fuerza vascular ajustables ³⁷³. Las superficies lumenales vasculares están revestidas por una capa de células endoteliales, que a su vez están cubiertas por un glicocálix denso y muy sialilado ³⁷⁴. Estos glicoconjugados sialilados participan en la regulación de las interacciones célula-célula para (a) las uniones celulares entre las células endoteliales y (b) el contacto entre las células endoteliales y las células sanguíneas circulantes. También desempeñan un papel como receptores vasculares que modulan la unión de ligandos solubles y su señalización ³⁷⁵. Además, los ácidos siálicos proporcionan cargas superficiales negativas netas a las células endoteliales vasculares y a los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por lo tanto, la sialilación, o la adición covalente de ácidos siálicos a los extremos de los glicoconjugados, y la desialilación, o la eliminación del ácido siálico de los glicoconjugados, representan una parte fundamental del metabolismo del ácido siálico en una variedad de procesos ^{53,171}.

Dado que los ácidos siálicos recubren todas las superficies celulares, muchas moléculas circulatorias y la mayoría de los complejos moleculares, la alteración de estos monosacáridos podría tener efectos variados, incluyendo potencialmente un papel en la patogénesis de las ECV ^{27,376,377}. La desialilación, por ejemplo, se reconoce como uno de los pasos más importantes en la cascada patológica pro-aterogénica ³⁷⁸. En las células aórticas intimaes humanas cultivadas, el depósito de colesterol aumenta significativamente cuando las LDL se tratan con sialidasa antes de la adición al cultivo ³⁷⁸. La disminución del contenido de ácido siálico de las LDL conduce a una mayor formación de agregados, que son fácilmente absorbidos por las células musculares lisas. Además, algunos ácidos siálicos libres, como el Neu5Gc no humano, también podrían ser factores de riesgo potenciales para las ECV ³⁷⁹ o servir como biomarcador para ello. El Neu5Gc se acumula en las superficies endoteliales y en las placas ateroscleróticas, donde los anticuerpos anti-Neu5Gc pueden desencadenar la activación endotelial y la inducción de la inflamación vascular ³⁸⁰. Sin

embargo, a pesar de estos estudios *in vitro*, la correlación clínica entre los ácidos siálicos séricos, los anticuerpos anti-Neu5Gc y su relación con las ECV sigue sin estar clara (Tabla 1).

Al comparar el contenido de ácidos siálicos en el tejido adiposo entre individuos que seguían patrones dietéticos habitualmente vegetarianos u omnívoros, se encontraron niveles significativamente más altos de Neu5Ac en veganos y lacto-ovo-vegetarianos en comparación con los omnívoros ³⁵⁷. Estos hallazgos podrían ser comparables con otros estudios que informan sobre los efectos cardiometabólicos intrínsecamente protectores de la suplementación con Neu5Ac o ManNAc ^{379,381,382}. A pesar de esto, aún no se han establecido los efectos beneficiosos de Neu5Ac dietético en sujetos vegetarianos. Sin embargo, los efectos positivos de una dieta vegetariana en este contexto se podrían inferir, entre otras cosas, dado el bajo riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular entre estos individuos ³⁸³.

1.8.3. Cáncer

El sistema inmunitario puede ser dirigido de varias maneras para identificar y atacar tumores ³⁸⁴. Los ácidos siálicos protegen las superficies del huésped al resistir las reacciones inmunitarias inapropiadas contra los antígenos propios. Esto suprime eficazmente la respuesta inmunitaria. En este contexto, los glicanos, incluidos los ácidos siálicos terminales, representan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) ³⁸⁵. Como resultado, los ácidos siálicos desempeñan un papel fundamental en la modulación de la reactividad inmunitaria al servir como una señal de auto-reconocimiento de varias maneras, incluyendo (a) a través de las interacciones del complemento, (b) a través de la alteración de la eliminación de patógenos mediada por anticuerpos, o (c) a través de lectinas similares a las inmunoglobulinas de unión al ácido siálico (Siglecs) ³⁸⁶. En consecuencia, las estrategias que interrumpen la evasión inmunitaria mediada por el ácido siálico, como dirigirse a las interacciones de Siglec o modular la expresión de sialoglicanos, son prometedoras para mejorar el reconocimiento inmunitario y las terapias contra el cáncer.

Tabla 1. Ácidos siálicos y su asociación con enfermedades cardiometabólicas

Título	Enfoque		Año	Hallazgos	Ref.
	Animal	Humano			
Relation of serum sialic acid to blood coagulation activity in type 2 diabetes		x	2002	El nivel sérico de ácido siálico se correlaciona positivamente con (a) la actividad de coagulación sanguínea y (b) los niveles circulatorios de fibrinógeno.	136
High fat diet-induced inflammation and oxidative stress are attenuated by N-acetylneuraminic acid in rats	x		2005	Neu5Ac podría ser útil para prevenir la inflamación y el estrés oxidativo asociados con la hiperlipidemia.	387
Relationship between Sialic acid and metabolic variables in Indian type 2 diabetic patients		x	2005	Entre los pacientes indios con diabetes tipo 2, los niveles elevados de ácido siálico sérico y urinario, así como de microalbúmina, están fuertemente asociados con complicaciones microvasculares.	388
Percentage of body fat and plasma glucose predict plasma sialic acid concentration in type 2 diabetes mellitus		x	2006	El porcentaje de grasa corporal se correlaciona con los niveles plasmáticos de ácido siálico y contribuye a elevar las concentraciones de ácido siálico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.	135
Sialic acid and oxidizability of lipid and proteins and antioxidant status in patients with coronary artery disease		x	2007	Los pacientes con EAC muestran aumentos significativos en los niveles de ácido siálico total y marcadores de estrés oxidativo. Además, los niveles más altos de TSA se correlacionan con una mayor gravedad de la EAC.	369
N-Acetylneuraminic Acid Supplementation Prevents High Fat Diet-Induced Insulin Resistance in Rats through Transcriptional and Nontranscriptional Mechanisms	x		2015	La administración de una dosis baja de ácidos siálicos previene la resistencia a la insulina en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas.	389
N-Acetylneuraminic acid attenuates hypercoagulation on high fat diet-induced hyperlipidemic rats	x		2015	Los datos muestran que Neu5Ac previene los niveles altos de lípidos en sangre inducidos por la dieta alta en grasas y el aumento asociado de la coagulación sanguínea en ratas.	381
Sialidase downregulation reduces non-HDL cholesterol, inhibits leukocyte transmigration, and attenuates atherosclerosis in ApoE knockout mice	x		2018	La disminución de la expresión o función de Neu1 reduce la aterosclerosis en ratones al afectar sustancialmente el metabolismo de los lípidos y la inflamación.	(390)
Supplementation with the Sialic Acid Precursor N-Acetyl-D-	x	x	2019	Las intervenciones dirigidas a la IgG hiposialilada y al FcγRIIB, como la suplementación con ManNAc, podrían	382

Mannosamine Breaks the Link between Obesity and Hypertension			romper el vínculo entre la obesidad y la hipertensión y proporcionar nuevos enfoques terapéuticos.		
Neuraminidasas 1 and 3 trigger atherosclerosis by desialylating low-density lipoproteins and increasing their uptake by macrophages	x	x	2021	Las neuraminidasas 1 y 3 inician la aterosclerosis y la formación de estrías grasas aórticas.	138
Sialic acid metabolism as a potential therapeutic target of atherosclerosis Sialic acids Neu5Ac and KDN in adipose tissue samples from individuals following habitual vegetarian or non-vegetarian dietary patterns		x	2023	Las concentraciones de Neu5Ac son significativamente más altas en los veganos y lacto-ovo-vegetarianos en comparación con los omnívoros. Se observó una asociación inversa significativa entre los niveles de KDN y el índice de masa corporal.	357

Extraído de: Guerrero-Flores, G.N., et al. (2025). Sialic Acids in Health and Disease.

Las lectinas representan una familia de receptores inmunomoduladores ubicados en las superficies de granulocitos, monocitos, células presentadoras de antígenos y células asesinas naturales. Comúnmente, los Siglecs contienen un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) dentro del dominio citoplasmático ^{141,391,392}. Un subconjunto de estos, Siglecs 14-16, no posee un ITIM, sino que contiene dentro de su región transmembrana un residuo de lisina, que facilita las interacciones con las proteínas adaptadoras que contienen motivos activadores basados en tirosina (ITAM) ³⁹³.

La función del sistema inmunitario durante la formación y progresión del tumor, o en el desarrollo de resistencia y erradicación de neoplasias emergentes, tumores en estadio tardío y micrometástasis, no está totalmente clara ³⁹⁴. La teoría de la vigilancia inmunitaria sostiene que el sistema inmunitario escanea constantemente las células y los tejidos, y que esa vigilancia inmunitaria siempre alerta es responsable de reconocer y eliminar la mayoría de las células cancerosas tempranas y los tumores nacientes ³⁹⁵. La detección de células anormales puede ocurrir cuando se produce una expresión superficial aberrante de los glicanos sialilados SLeA, SLeX, STn o GM2 (Figura 8) ^{55,391,396–398}. Esto puede ser el resultado de la actividad regulada al alza de las sialiltransferasas, lo que conduce a la incorporación de varios ácidos siálicos de superficie (Tabla 2) ^{56,399}. Sin embargo, una vez que los Siglecs se unen a los glicanos sialilados en las células cancerosas, también se puede promover la señalización inmunosupresora ^{400–402}. Por ejemplo, la muerte de las células tumorales mediada por células asesinas naturales (NK) se inhibe mediante

las interacciones entre Siglec-7 o Siglec-9 expresadas en NK y los glicanos sialilados, que sirven como ligandos de Siglec en las células tumorales ²⁴⁷.

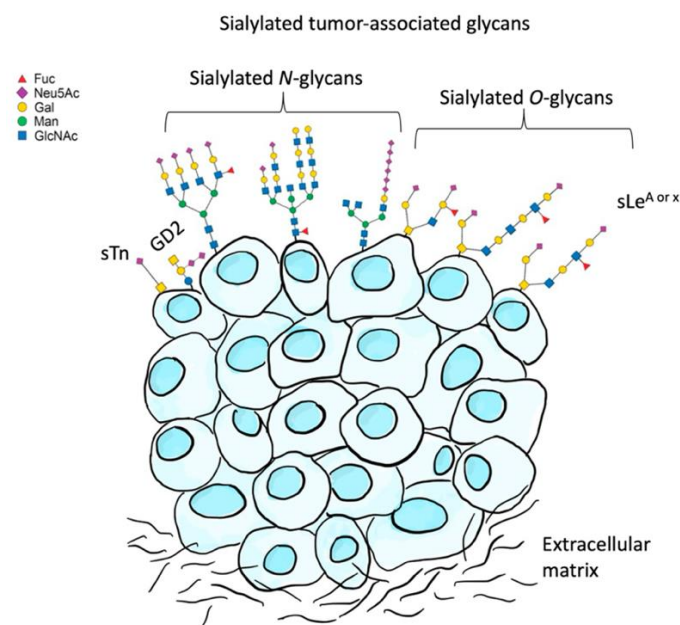


Figura 8. Glicanos sialilados en el cáncer. Las células tumorales tienen niveles aumentados de glicanos sialilados en su superficie celular, incluidos sialyl LewisA (SLeA), sialyl LewisX (SLeX) y sialyl-Tn (sTn). GD2, disialogangliosido. Extraído de: Guerrero-Flores, G.N., et al. (2025). Sialic Acids in Health and Disease.

Tabla 2. Concentraciones de ácido siálico en cáncer humano, en diferentes células tumorales					
Cáncer	Neu5Ac		Neu5Gc		KDN Ref.
Cáncer endometrial (µg/g)	$6,99 \times 10^5 \pm 3,05 \times 10^2$		$1,3 \times 10^4 \pm 5 \times 10^3$		- 403
Células de osteosarcoma (µg/mL)	53,6		17,5		0,36 404
Cáncer de próstata (µg/100 µg proteína)	$3,09 \times 10^{-5}$ - $6,04 \times 10^{-2}$		-		- 405
Cáncer pancreático (µg/L)	$9,27 \times 10^{-3}$ - $3,7 \times 10^{-3}$		-		- 140
Cáncer de esófago (µg/g)	85		0,03		2 354
Mesotelioma maligno (µg per 10 ⁶ cells)	Cultivo celular	Extracto de membrana cel	Cultivo celular	Extracto de membrana cel	- 406

STAV-FCS	5,05	Traces	35,77	20,37		
STAV-AB	10,85	ND	13,66	19,23		
Wester	11,53	ND	18,65	25,3		
Células de adenocarcinoma(μg per 10 ⁶ cells)						
Wart	6	Traces	16,51	21,12		
Células de osteosarcoma (μg per 10 ⁶ cells)	3,97	-	2,75	4,48	-	407

KDN, ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonónico; Neu5Ac, ácido N-acetilneuramínico; Neu5Gc, ácido N-glicolilneuramínico; ND, no detectado; STAV-AB, línea celular cancerosa, específicamente, mesotelioma maligno; STAV-FCS, sublínea de células cancerosas, específicamente, el fenotipo sarcomatoide del mesotelioma. Extraído de: Guerrero-Flores, G.N., et al. (2025). Sialic Acids in Health and Disease.

A través de un proceso de inmunoedición³⁹⁵, se seleccionan células tumorales que, como parte de las estrategias evasivas, imitan los patrones de glicosilación de las células sanas utilizando señales "propias" de glicanos sialilados en la superficie^{408,409}. Este mecanismo podría representar un posible punto de control inmunitario para el cáncer, dado que en el contexto tumoral, las células inmunitarias pueden producir sialoglicanos aberrantes como ligandos principales para los Siglec^{410,411}. Por lo tanto, es factible dirigirse al punto de control glicoinmune sialoglicano-Siglec mediante el empleo de anticuerpos bloqueadores de Siglec. Un enfoque alternativo podría ser reducir la densidad de ligandos dirigiéndose a los sialoglicanos⁴¹². Se ha demostrado, por ejemplo, que cuando el glico-perfil de una célula cancerosa se altera por hipersialilación (un incremento en los residuos de ácido siálico de hasta un 40-60%)⁴⁰⁸, que se produce mediante la regulación al alza de las sialiltransferasas, la regulación a la baja de las neuraminidasas o una combinación de ambas, el tumor se vuelve más agresivo, lo que provoca metástasis y quimiorresistencia^{37,408}. Esto sugiere que la regulación a la baja de la sialilación superficial de las células cancerosas puede hacerlas menos agresivas y más accesibles para el sistema inmunitario.

1.8.3.1. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los cánceres más comunes y se asocia con una de las tasas de mortalidad más altas del mundo⁴¹³. Es el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado entre los hombres y el segundo entre las mujeres⁴¹⁴. Numerosos estudios informan asociaciones entre los factores dietéticos y el riesgo total de cáncer^{383,415–419}. Se estima que la dieta y la nutrición

explican hasta el 30-50% de la incidencia mundial de CCR ⁴²⁰. Por ello, los enfoques dietéticos para la prevención del cáncer son de gran interés ³⁸³, por su impacto como modificadores de riesgo dentro del proceso “multistep” de la tumorigénesis colorrectal ⁴²⁰. En este contexto, las dietas vegetarianas se asocian con una menor incidencia general de cáncer colorrectal ³⁸³. Por el contrario, el consumo de carnes rojas y procesadas se asocia con un mayor riesgo de cáncer de colon y recto ⁴²¹⁻⁴²⁴.

Múltiples mecanismos explican los posibles efectos promotores del cáncer asociados con el consumo de carnes rojas o procesadas. Estos incluyen (a) daño al ADN debido a los efectos tóxicos y mutagénicos de los compuestos N-nitrosos producidos durante el asado a alta temperatura ⁴²⁵, (b) una ingesta dietética elevada de sal y grasas saturadas ⁴²⁶, (c) efectos pro-oxidantes del hemo y del hierro hemo ⁴²⁷, (d) producción de trimetilamina (TMA) por el microbioma intestinal, que posteriormente es oxidada por las enzimas hepáticas para formar *N*-óxido de trimetilamina (TMAO) ^{139,428}, (e) alteración de la composición del microbioma intestinal humano ¹⁴², y (f) el aumento de los niveles de virus contaminantes que causan cáncer ⁴²⁹.

La hipótesis de la *xenosialitis* como un aspecto de la inflamación crónica está siendo cada vez más discutida ²⁹. El cuerpo humano sintetiza sus propios ácidos siálicos, además de los azúcares dietéticos obtenidos exógenamente, como se ha comentado ^{34,78}. Dichas fuentes dietéticas pueden incluir Neu5Gc, especialmente de alimentos como la carne roja, la leche o los productos lácteos ^{109,430,431}. Se ha sugerido que Neu5Gc podría ser un factor de riesgo potencialmente agravante para el carcinoma ⁴²⁸. El mecanismo probable propuesto se basa en estudios de modelos de ratón ^{111,120,424}. Los dos principales contribuyentes son: (a) el hecho de que los seres humanos tienen una mutación en el gen CMAH, que codifica la citidina monofosfato-N-acetilneuramínico hidroxilasa (Cmah), que convierte Neu5Ac en Neu5Gc ^{114,120,275,432}, y (b) el hecho de que los seres humanos pueden metabolizar el Neu5Gc de la dieta e incorporarlo durante la formación de glicanos humanos nativos en lugar del Neu5Ac generalmente asimilado ^{120,433}. Por lo tanto, se pueden expresar múltiples instancias de neoantígenos glicanos potencialmente inmunogénicos que contienen Neu5Gc en las superficies epiteliales del colon ¹²⁰. Como resultado, se pueden activar dos mecanismos diferentes: (1) la vía de señalización canónica NF-κB, que regula la transcripción de factores inflamatorios, y (2) la formación *in situ* de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo ¹¹¹. Ambos procesos promueven la inflamación sistémica y el posterior daño tisular ⁴³⁴. En

consecuencia, cada uno de ellos podría explicar la relación entre una dieta rica en carne roja y el carcinoma de colon.

Esta hipótesis de la *xenosialitis* fue probada, con algunos resultados mixtos. Dado que se sabe que las células anti-T policlonales de conejo IgG (ATG) provocan una respuesta inmunitaria en los seres humanos hacia Neu5Gc ⁴³⁵, se probaron receptores de aloinjertos tratados con IgG de origen animal. Sin embargo, en un estudio, no se encontró evidencia de que la exposición a niveles más altos de anti-Neu5Gc se relacione con una mayor incidencia de carcinoma de colon ⁴³⁶. En contraste, en otro estudio de 71 sujetos, se informó una asociación positiva entre el riesgo total de anti-Neu5Gc y el CCR ¹³⁹. Sin embargo, aún no se ha demostrado una asociación significativa entre la IgG anti-Neu5Gc y la ingesta dietética de carne roja ¹³⁹. Curiosamente, un estudio diferente informó un claro vínculo entre los niveles y el repertorio de IgG sérica anti-Neu5Gc y Neu5Gc del consumo dietético de carne roja y lácteos ¹²⁰.

Se necesitan más investigaciones con el poder estadístico adecuado para dilucidar los vínculos entre la dieta, Neu5Gc, anti-Neu5Gc y el riesgo de este tipo de enfermedad crónica.

1.8.4. El Estudio Adventista de Salud 2 (AHS-2)

A través de los estudios de cohorte se investigan posibles asociaciones entre un factor al cual se exponen los participantes y el resultado de la aparición de alguna enfermedad de interés o el efecto de una o más características de los participantes en los resultados pronósticos ^{437,438}. En este tipo de estudios, los participantes se clasifican en dos grupos: unos expuestos al factor y otros no expuestos al factor ⁴³⁹. La clasificación se hace al inicio del estudio cuando todos los participantes están libres de la enfermedad de interés ⁴³⁹. Luego, estos son seguidos durante un período de tiempo para observar la frecuencia de aparición del fenómeno de interés. Los estudios de cohorte son de tipo observacionales longitudinales y pueden ser prospectivos o retrospectivos ⁴⁴⁰: los prospectivos se inician antes de la aparición de la enfermedad (a veces, antes de la exposición al riesgo) y en los retrospectivos la enfermedad ya ha tenido lugar, sin embargo, los pacientes están previamente definidos por la exposición al factor de riesgo ⁴⁴⁰.

El Estudio Adventista de Salud-2 (AHS-2, por sus siglas en inglés) es un estudio de cohorte de 96.469 hombres y mujeres de iglesias adventistas distribuidas geográficamente en Estados Unidos y Canadá con el objetivo de relacionar las opciones de estilo de vida, particularmente la

dieta, con los resultados de salud ¹³³, y cuyos participantes fueron reclutados entre 2002 y 2007 ⁴⁴¹. Esta cohorte es relativamente única por su amplia gama de patrones dietéticos en comparación con la población occidental general. En concreto, el 8 % son veganos, el 28 % son lacto-ovo-vegetarianos, el 16 % son semi o pesco-vegetarianos y el 48 % no son vegetarianos. También existe una gran variación en el consumo de alimentos vegetales, como nueces, soja, otras legumbres y granos ⁴⁴².

La mayoría de los participantes del estudio son caucásicos y negros/afroamericanos, incluyendo otras minorías étnicas, con 30 años o más y con suficiente dominio del inglés. Estos completaron un extenso cuestionario de estilo de vida que incluyó un cuestionario de frecuencia alimentaria diseñado para evaluar la ingesta habitual de ciertos alimentos y clasificar a los participantes según su patrón dietario ⁴⁴¹. Todos los participantes, al momento de inscribirse, firmaron el consentimiento informado ^{441,443}. Los métodos de reclutamiento y selección de la cohorte se han descrito anteriormente con detalle ¹³³.

Parte de la comprensión sobre los efectos en la salud de las dietas vegetarianas proviene de algunos estudios de cohortes, especialmente en el AHS-2 ⁴⁴⁴ y los vegetarianos británicos ⁴⁴⁵⁻⁴⁴⁷. En diferentes análisis de datos de los participantes del AHS-2 se ha mostrado la prevalencia de enfermedades en función de la dieta. Por ejemplo, se examinó la prevalencia de obesidad, el síndrome metabólico, la hipertensión, la diabetes mellitus, la densidad ósea y el riesgo de fractura, la mortalidad y el cáncer (considerados como todos los cánceres combinados y por sistema de órganos) ⁴⁴⁴. En general, los participantes vegetarianos, en comparación con omnívoros, presentaron: (a) valores menores de IMC ^{448,449}; (b) niveles más favorables en todos los componentes del síndrome metabólico, relacionados con la trigliceridemia, presión arterial diastólica, presión arterial sistólica, circunferencia de cintura, IMC y glicemia, excepto para HDL ⁴⁵⁰; (c) menor prevalencia de hipertensión ⁴⁵¹; (d) menor prevalencia de diabetes mellitus; (e) reducciones significativas en el riesgo para varios tipos de cánceres ⁴⁵²; y (f) una reducción de la mortalidad por todas las causas estudiadas ⁴⁴¹.

No obstante, la evidencia disponible sobre la influencia del tipo de dieta, el índice de masa corporal, la edad, el sexo y la raza sobre los niveles de ácidos siálicos y sus precursores en humanos es aún limitada. Asimismo, la relación entre estos compuestos y las enfermedades crónicas no

transmisibles no ha sido suficientemente caracterizada en estudios de cohorte con características epidemiológicas como el AHS-2.

Dado que los ácidos siálicos participan en múltiples procesos biológicos relacionados con la señalización celular, la inflamación y el metabolismo, esta falta de conocimiento limita la comprensión de los mecanismos que podrían vincular la alimentación y otras características individuales con procesos asociados al desarrollo de enfermedades crónicas. En consecuencia, resulta relevante determinar en qué medida el patrón dietario, la edad, el sexo, la raza y el índice de masa corporal se asocian con las concentraciones de KDN, Neu5Ac y su precursor ManNAc, así como explorar su relación con enfermedades crónicas no transmisibles. En este contexto, la cohorte AHS-2 constituye una oportunidad excelente para investigar dichas asociaciones en una población con diferentes tipos dietarios y características demográficas.

2. PREGUNTA E HIPÓTESIS

¿En qué medida el tipo de dieta, la edad, el sexo, la raza y el índice de masa corporal se asocian con los niveles de KDN, Neu5Ac y su precursor (ManNAc) en humanos, y cómo se relacionan estos niveles con la presencia de enfermedades crónicas no transmisibles?

Se hipotetiza que el tipo de dieta, las características sociodemográficas y el índice de masa corporal se asocian con diferencias en las concentraciones de KDN, Neu5Ac y su precursor metabólico ManNAc en humanos. Asimismo, se plantea que las variaciones en estos monosacáridos podrían asociarse con la presencia de enfermedades crónicas no transmisibles.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar las concentraciones de Neu5Ac y KDN en tejido adiposo y Neu5Ac, KDN y ManNAc en suero, y la asociación entre los patrones dietarios de individuos omnívoros, lacto-ovo-vegetarianos y veganos, en participantes del AHS-2 y las características demográficas y medidas antropométricas.

3.2. Objetivos específicos

1. Establecer un método para la extracción de formas totales de KDN y Neu5Ac en tejido adiposo, así como formas totales y libres de estos monosacáridos y ManNAc en suero de participantes del AHS-2.
2. Desarrollar un método de LC-MS/MS para la medición de KDN y Neu5Ac en tejido adiposo, y de KDN, Neu5Ac y ManNAc en suero de participantes del AHS-2.
3. Cuantificar las concentraciones de KDN y Neu5Ac en muestras de tejido adiposo, y de KDN, Neu5Ac y ManNAc en suero de participantes del AHS-2, y comparar los niveles entre individuos que siguen patrones dietéticos habituales, vegetarianos u omnívoros a largo plazo, así como entre grupos raciales.
4. Investigar las asociaciones entre las características demográficas e índice de masa corporal de participantes en la cohorte del AHS-2 en relación con las concentraciones de KDN y Neu5Ac en tejido adiposo y KDN, Neu5Ac y ManNAc en suero.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Muestras humanas de tejido adiposo y suero

En el presente estudio observacional analítico de corte transversal se midieron las concentraciones de ácidos siálicos en 156 muestras de tejido adiposo humano de participantes de la cohorte del Estudio Adventista de Salud-2 (AHS-2) en el “Mass Spectrometry Core Facility” de la Universidad de Loma Linda, California, Estados Unidos. La cohorte AHS-2 se estableció entre 2002 y 2007 y consta de más de 96.000 adventistas del séptimo día en los EE. UU. UU. y Canadá, con una proporción considerable (~ 50%) de vegetarianos. Los participantes del estudio completaron un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos al inicio del estudio; se definieron como veganos ($n = 52$; vegetarianos estrictos con evitación completa de todos los productos de origen animal o consumo < 1 /mes), lacto-ovo-vegetarianos ($n = 56$; evitando todas las carnes, pero consumiendo lácteos y/o huevos ≥ 1 /mes) y omnívoros ($n = 48$; consumiendo carnes, no solo pescado, ≥ 1 /mes). A partir del cuestionario basal se calculó la información sociodemográfica y el índice de masa corporal (IMC).

Este estudio incluyó la selección de aproximadamente el mismo número de muestras (155) de participantes veganos, lacto-ovo-vegetarianos y omnívoros que previamente proporcionaron muestras biológicas, incluyendo tejido adiposo y sangre ^{453,454}. Entre los participantes seleccionados, 4 presentaban antecedentes de enfermedad cardiovascular (CVD) y 12 reportaron diagnóstico previo de hipertensión, lo que permitió explorar los niveles de los monosacáridos en estudio en función de la presencia o ausencia de estas condiciones.

Las muestras de tejido adiposo se obtuvieron aspirando una muestra subcutánea de grasa del glúteo con aguja y jeringa, y se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido ¹³³. Así mismo, para las pruebas previas al uso de muestras humanas de tejido adiposo, se obtuvieron muestras de tejido adiposo de vaca, cerdo, cordero y aves de corral en supermercados locales del Sur de California, USA. Por otro lado, las muestras de sangre en ayunas fueron obtenidas por venopunción, coaguladas y centrifugadas. El suero separado se almacenó en nitrógeno líquido.

4.1.2. Consideraciones éticas

Este estudio fue revisado y aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Loma Linda (IRB #48134, #5190039). Los procedimientos asociados a este proyecto se

gestionaron de acuerdo a los estándares éticos internacionales recomendados por el Protocolo de Helsinki para la investigación en humanos, y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes.

4.2. Descripción de procedimientos y técnicas

4.2.1. Equipo para cuantificación de monosacáridos

La columna Accucore HILIC (150 mm × 4,6 mm, 2,6 µm de partículas) se obtuvo de Thermo Scientific (Waltham, MA) y se conectó con una precolumna Accucore HILIC (10 mm × 4,6 mm, 2,6 µm).

El equipo utilizado para el análisis de monosacáridos incluyó un HPLC Agilent 1200 junto con un espectrómetro de masas cuádruple triple modelo 6410 detector de Agilent Technologies (Santa Clara, CA). El procesamiento de los datos se realizó con el software Agilent Mass Hunter, versión B.07.01. Se utilizaron los parámetros de cromatografía y fuente de iones por electrospray (ESI) como se describió anteriormente ^{35,455}.

El formato de amonio, el ácido trifluoroacético (TFA) y el acetonitrilo se obtuvieron de Fisher Scientific (Carlsbad, CA). Neu5Ac-D-1,2,3-¹³C₃, KDN, Neu5Ac y metanol se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MI), la ManNAc y *N*-acetil-D-[uniformemente marcado (UL)-¹³C₆]manosamina de Omicron Biochemicals, Inc (South Bend, IN) y el cloroformo se obtuvo de EMD Millipore (Burlington, MA). En todo el protocolo del estudio se utilizó agua Milli-Q (sistema de agua ultrapura GenPure Pro con fotooxidación UV y monitor de TOC, de Thermo Scientific Inc.).

4.2.2. Preparación de muestras estándar

Los controles de muestra se prepararon por dilución en agua Milli-Q. Neu5Ac-D-1,2,3-¹³C₃ y *N*-acetil-D-[uniformemente marcado (UL)-¹³C₆] manosamina se utilizaron como controles internos (ISs), debido a su estructura y comportamiento similares a los analitos durante la separación cromatográfica de ácidos siálicos y ManNAc, lo que permitió correcciones para posibles efectos de supresión/mejora de iones ^{456,457}. Además, los controles internos proporcionan un control de calidad interno y facilitan la corrección de las variables de medición no contabilizadas. Además, se realizaron controles positivos con IS (30 ng/mL y 200 ng/mL para el

ensayo con muestras de tejido adiposo y muestras de suero, respectivamente) en agua antes, durante y después de cada análisis por lotes.

4.2.3 Análisis estadísticos con datos obtenidos en muestras de tejido adiposo

Se llevaron a cabo análisis descriptivos, ajustando los datos demográficos y comparando los tres grupos dietéticos: veganos, lacto-ovo-vegetarianos y omnívoros. En los análisis inferenciales, el valor de p fue calculado mediante la prueba de chi-cuadrado para variables categóricas y ANOVA para variables continuas. Para comparar los ácidos siálicos entre los grupos de dieta, primero se transformaron logarítmicamente los valores de los ácidos siálicos, y luego se ajustó un modelo de regresión lineal para examinar la asociación entre el estado dietético vegetariano (vegano o lacto-ovo-vegetariano frente a no vegetariano, y vegano frente a lacto-ovo-vegetariano) y los niveles de los ácidos siálicos, donde el ácido siálico fue la variable dependiente/respuesta, y el patrón dietético fue la variable predictora de interés. Las covariables incluyeron la raza (de raza negra vs blanca), la edad de extracción de sangre, el sexo (hombre frente a mujer) y el IMC (Kg/m^2). Se obtuvieron coeficientes beta e intervalos de confianza del 95% para cada comparación entre el grupo de dieta y el ácido siálico, junto con las medias predichas ajustadas y los intervalos de confianza del 95%, proporcionando una estimación marginal del logaritmo de la media de los valores de ácido siálico no transformados para vegetarianos y omnívoros, y posteriormente retrotransformados a la escala original.

Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron en RStudio 2024.09.0+375 y R versión 4.4.12.4.

4.2.4 Análisis estadísticos con datos obtenidos en muestras de suero

Para investigar las posibles asociaciones entre las características demográficas de estos participantes y ManNAc, KDN o Neu5Ac, libre, conjugado o total, se emplearon métodos estadísticos no paramétricos debido a distribuciones no normales, según lo indicado por la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Se realizaron pruebas U de Mann-Whitney para variables continuas. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado para comparar variables categóricas, específicamente dieta, sexo y raza. Para explorar la relación entre la raza y las concentraciones libres, conjugadas y totales de ManNAc, KDN y Neu5Ac, se generaron modelos de regresión lineal múltiple después de la primera transformación logarítmica de las variables dependientes. Los

modelos se generaron con las variables independientes de interés, incluidas la dieta, el IMC y factores demográficos como el sexo o la raza. Sus asociaciones se exploraron con los niveles séricos de ManNAc, KDN y Neu5Ac. Se generaron modelos separados para cada variable de resultado: ManNAc libre, ManNAc conjugado y ManNAc total; KDN, Neu5Ac libre, Neu5Ac conjugado y Neu5Ac total. Posteriormente, se verificó la normalidad de los modelos utilizando gráficos Q-Q y la prueba de Shapiro-Wilk para los residuos. Cuando correspondía, se realizaron transformaciones inversas para interpretar los coeficientes en la escala original. Se informaron valores ajustados de R cuadrado y estadísticas F para evaluar la aptitud del modelo.

Además, para determinar la probabilidad de tener hipertensión en función de las concentraciones de Neu5Ac, se aplicaron modelos de regresión logística ajustados. Complementariamente, se exploraron posibles asociaciones entre hipertensión y mayores niveles de Neu5Ac y de ManNAc, mediante modelos de regresión lineal ajustados.

La significación estadística se determinó en $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron en RStudio 2024.09.0+375 y R versión 4.4.12.4.

5. RESULTADOS

5.1. Objetivo específico 1

Establecer un método para la extracción de formas totales de KDN y Neu5Ac en tejido adiposo, así como formas totales y libres de estos monosacáridos y ManNAc en suero de participantes del AHS-2.

Extracción de ácidos siálicos del tejido adiposo

El procesamiento de la muestra se ilustra en la figura 8. Se añadió una solución de 100 μ L de cloroformo, metanol y agua (1:2:0,8) a muestras humanas o animales y se agitó cuidadosamente en un *vortexer* durante 1 minuto, seguido de una incubación durante 30 minutos en hielo antes de la sonicación. Se realizaron diez ciclos de sonicación de 5 segundos cada uno con una amplitud del 20% (120 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific Sonicator) produciendo una mezcla de ácidos siálicos libres y conjugados. Tras la sonicación, se añadieron 20 μ L (150 ng/mL) del patrón interno a una concentración final de 30 ng/mL, para ayudar a controlar las variables de extracción, carga y detección⁴⁵⁸. Luego, la muestra fue agitada vigorosamente en el *vortexer* durante ~ 50 segundos. En este punto, se añadió una solución de cloroformo en agua (26,4 μ L) para generar una concentración final de 2:2:1,8 para cloroformo, metanol y agua, respectivamente. A continuación, la muestra se sometió a vórtice durante 10 segundos y se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos. Se separó el primer sobrenadante (70 μ L) y se añadieron 100 μ L de cloroformo, metanol y agua (1:2:0,8) al volumen restante. La segunda ronda de centrifugación fue seguida por la separación del sobrenadante (50 μ L). Las fracciones sobrenadantes se combinaron y secaron con SpeedVac (Savant SC 110A, Thermo Electron Corporation). Después del secado, se añadió a la muestra un TFA 0,15 M (100 μ L) y se incubó a 80 °C (Labnet, incubadora de agitación Vortemp 56) con agitación a 400 rpm durante 2 horas para la liberación de ácidos siálicos de lípidos o proteínas por hidrólisis³⁵. La muestra se centrifugaba y se evaporaba con SpeedVac. A continuación, esta muestra procesada seca se reconstituyó en 100 μ L de agua y se analizó mediante LC-MS/MS.

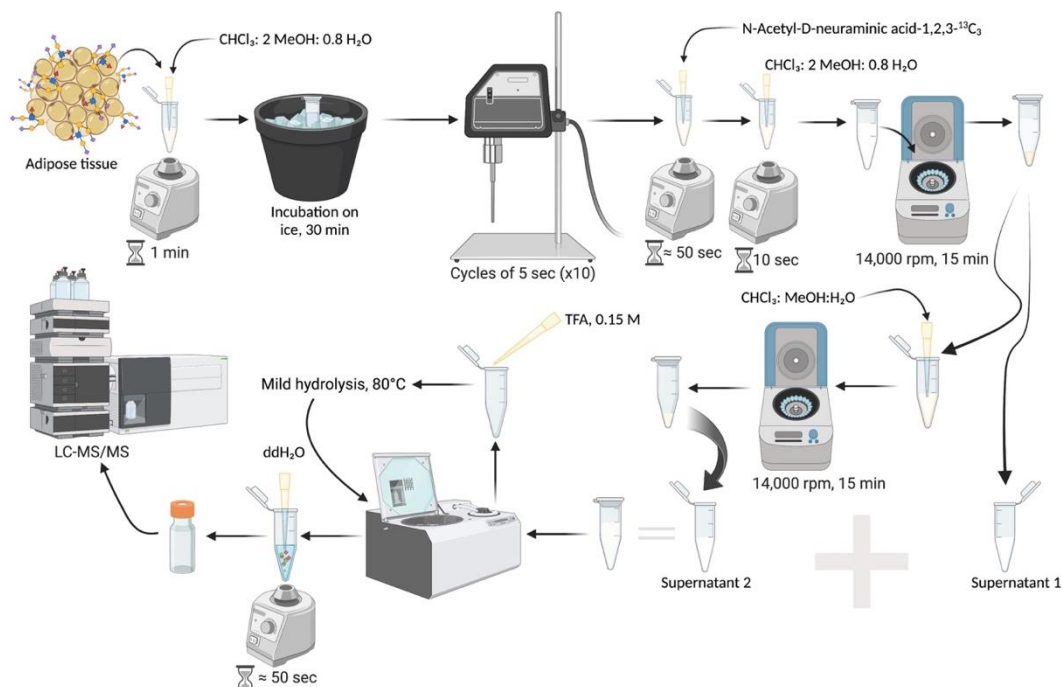


Figura 8. Procesamiento de muestras para la extracción, detección y cuantificación de ácidos siálicos a partir de tejido adiposo mediante LC-MS/MS. Creado con Biorender.

Extracción de ManNAc y Neu5Ac de muestras de suero

Antes de procesar sueros humanos, cada muestra se descongeló a temperatura ambiente, se mantuvo en hielo y se agitó en vórtice durante 30 segundos. Se utilizaron cuatro alícuotas séricas por sujeto para la extracción de los monosacáridos: (1) ManNAc total, (2) ManNAc libre, (3) Neu5Ac total y (4) Neu5Ac libre.

El ManNAc o Neu5Ac total (libre + conjugado) se evaluó de la siguiente manera: después del vórtice, se agregaron 4 µL de suero a una solución de agua pura (4,7 µL) con 21,3 µL de 5 µg/mL de ácido N-acetil-D-[UL-¹³C₆]manosamina o N-acetil-D-[1,2,3-¹³C₃]neuramínico y 10 µL de TFA (1 M). La mezcla se agitó completamente en vórtice durante 30 segundos y luego se incubó a 80 °C, con agitación a 400 rpm utilizando una incubadora de agitación Vortemp 56 Labnet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 1 hora, para liberar ManNAc y Neu5Ac de lípidos o proteínas por hidrólisis suave. Después de una hidrólisis ácida suave, la muestra se centrifugó (15.000 g, 5 minutos). Del sobrenadante, 15 µL se eliminaron y concentraron utilizando SpeedVac (Savant SC 110A, Thermo Electron Corporation, MA). Luego, la muestra seca se reconstituyó en 200 µL de agua, se agitó en vórtice y se analizó mediante LC-MS/MS (Figura 9). N-acetil-D-[UL-¹³C₆]manosamina o N-acetil-D-[1,2,3-¹³C₃]ácido neuramínico). El ManNAc o Neu5Ac libre se

evaluó de la siguiente manera: se agregó una mezcla fría (149,4 μL , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) de CH_3OH : CH_3CN : CH_3COCH_3 (1: 1: 1), seguida de vórtice durante 30 segundos e incubación en hielo durante 30 minutos. La muestra se centrifugó a 15.000 g durante 7 minutos, seguida de un secado de 60 μL de sobrenadante en el SpeedVac. La fracción libre seca se reconstituyó en 80 μL de agua, se agitó en vórtice y se analizó mediante LC-MS/MS (Figura 9). El nivel de formas conjugadas (ManNAc o Neu5Ac) se determinó indirectamente restando la concentración de azúcar libre de la cantidad total medida de ManNAc o Neu5Ac en cada individuo ^{459,460}.

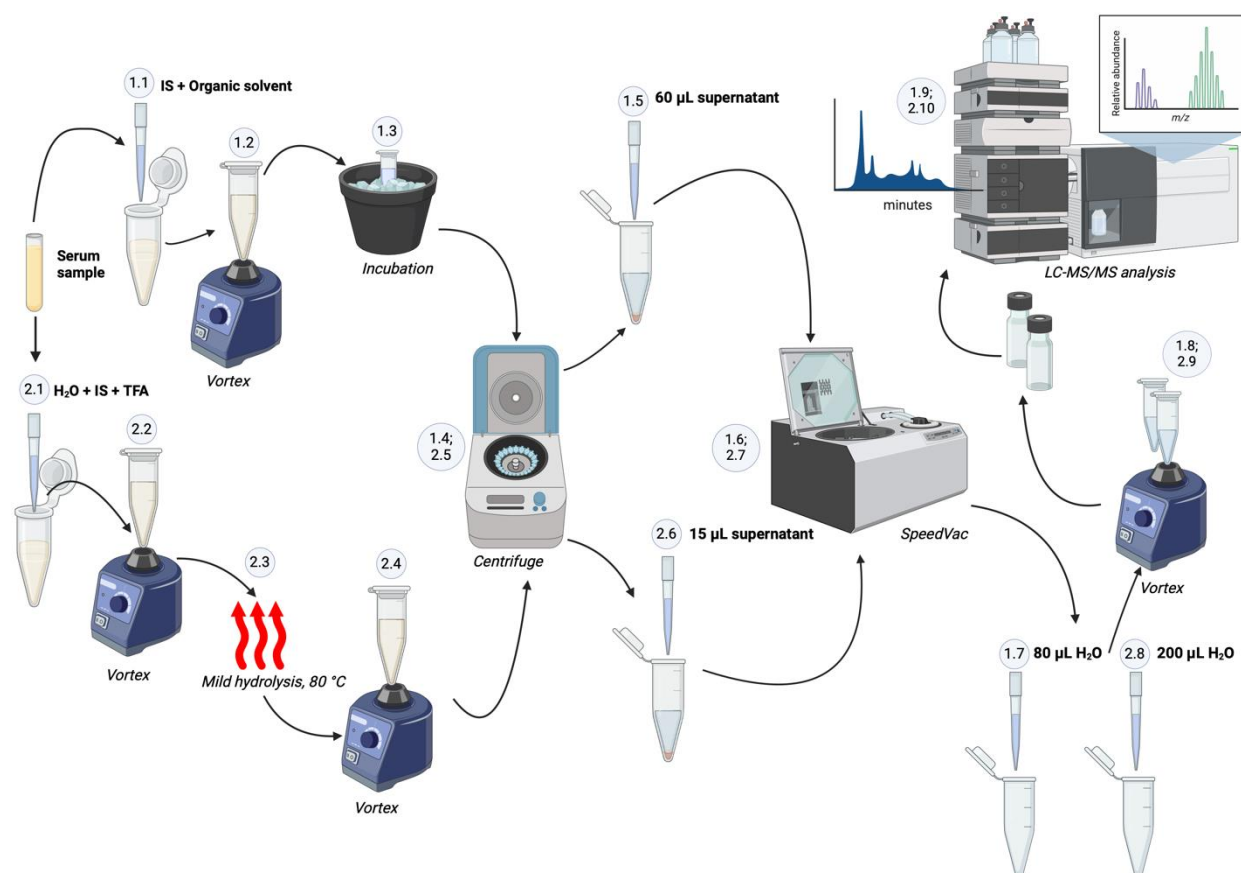


Figura 9. Extracción de ManNAc y Neu5Ac libres o totales (libres + conjugados) de muestras de suero. A partir de la muestra de suero, para el análisis de ManNAc y Neu5Ac libres, la extracción fue la siguiente: (1.1) Se mezcla una alícuota de 40 μL de suero con 10,6 μL de solución madre de IS de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ya sea *ácido N-acetil-D-[1,2,3- $^{13}\text{C}_{13}$]neuramínico* o *N-acetil-D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]manosamina*), a la que se le aplica una mezcla fría (149,4 μL , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) de CH_3OH : CH_3CN : CH_3COCH_3 (1:1:1); (1.2) las muestras se agitan en vórtice durante 30 segundos; (1.3) incubado en hielo durante 30 minutos; (1.4) seguido de centrifugación a 15.000 g durante 7 minutos; (1.5) de los cuales se toman 60 μL de sobrenadante; (1.6) y concentrado; (1.7) las fracciones libres secas se reconstituyen en 80 μL de agua pura; (1.8) vórtice; y (1.9) analizado mediante el procedimiento LC-MS/MS. La extracción de ManNAc y Neu5Ac totales de las muestras de suero es la siguiente: (2.1) 4 μL de muestras de suero se mezclan con 4,7 μL de agua, a las que se

añaden 21,3 μL de solución madre de IS (ya sea *ácido* N-acetil-D-[1,2,3- $^{13}\text{C}_{13}$]neuramínico o N-acetil-D-[$^{13}\text{C}_6$]manosamina) y 10 μL de TFA (1 M); (2.2) la mezcla se agita completamente en vórtice durante 30 segundos; (2.3) incubado a 80 °C con agitación a 400 rpm durante 1 h; (2,5) centrifugado a 15.000 g durante 5 minutos; (2.6) seguido de una separación de 15 μL de sobrenadante; (2.7) concentración; (2.8) reconstitución en 200 μL de agua pura; (2.9) vórtice; y (2.10) análisis en el sistema LC-MS/MS. Figura creada con BioRender.com.

5.2. Objetivo específico 2

Desarrollar un método de LC-MS/MS para la medición de KDN y Neu5Ac en tejido adiposo y de KDN, Neu5Ac y ManNAc en suero de participantes del AHS-2.

Curvas de calibración estándar para mediciones en muestras de tejido adiposo

Se prepararon curvas de calibración con diferentes concentraciones de ácidos siálicos. Para mejorar el rango de cuantificación del equipo LC-MS/MS, se construyeron dos curvas de calibración separadas con buena linealidad en los rangos bajo y alto para Neu5Ac y KDN. Además, se añadió una concentración fija de IS a cada calibrador. Las concentraciones estándar de KDN fueron: 0,0004, 0,0005, 0,0010, 0,0015, 0,0021, 0,0029, 0,0042, 0,0058, 0,0081, 0,0114 y 0,0160 $\mu\text{g/mL}$ para el rango bajo, y 0,0050, 0,0100, 0,0150, 0,0200, 0,0400, 0,0600, 0,0900, 0,0120, 0,0160, 0,20 y 0,26 $\mu\text{g/mL}$ para el rango alto. Del mismo modo, las concentraciones estándar de Neu5Ac fueron: 0,001, 0,0019, 0,0036, 0,013, 0,091, 0,174, 0,330, 0,629 y 1,2 $\mu\text{g/mL}$ para el rango bajo, y 0,8, 1,6, 2,4, 3,2, 4,0, 4,8, 5,6, 6,4 y 7,2 $\mu\text{g/mL}$ para el rango alto. Después de la corrección de las variaciones de la amplitud de cresta de IS, se utilizaron las amplitudes de la señal de cresta LC-MS/MS para KDN y Neu5Ac para construir las curvas de calibración. Además, se inyectó IS como referencia a intervalos regulares para un mayor control de calidad. Los límites inferiores de detección calculados fueron $\geq 2,0$ ng/mL para los tres ácidos siálicos⁴⁶¹. Los rangos inferiores de las líneas estándar se extendieron mediante el empleo de transformaciones ln-ln. Los coeficientes de correlación (r^2) para los tres ácidos siálicos fueron $> 0,980$.

Condiciones del sistema cromatográfico utilizado para la separación de monosacáridos en tejido adiposo

Las estructuras químicas de los ácidos siálicos estudiados se muestran en la Figura 2, particularmente, Neu5Ac y KDN. Los picos de HPLC para los estándares Neu5Ac y KDN se resuelven bien utilizando LC-MS/MS con tiempos de retención estables (Figura 10). Los tiempos de retención para Neu5Ac-D-1,2,3- $^{13}\text{C}_3$, KDN y Neu5Ac fueron 5,028, 5,036, 5,070 y 5,079 min, respectivamente. Los espectros de masas ESI de los iones padre e hijo, como se muestra en la

Figura 11, para Neu5Ac, KDN y Neu5Ac-D-1,2,3-¹³C₃ fueron elegidos debido a sus abundancias relativas ^{36,388,459,462}.

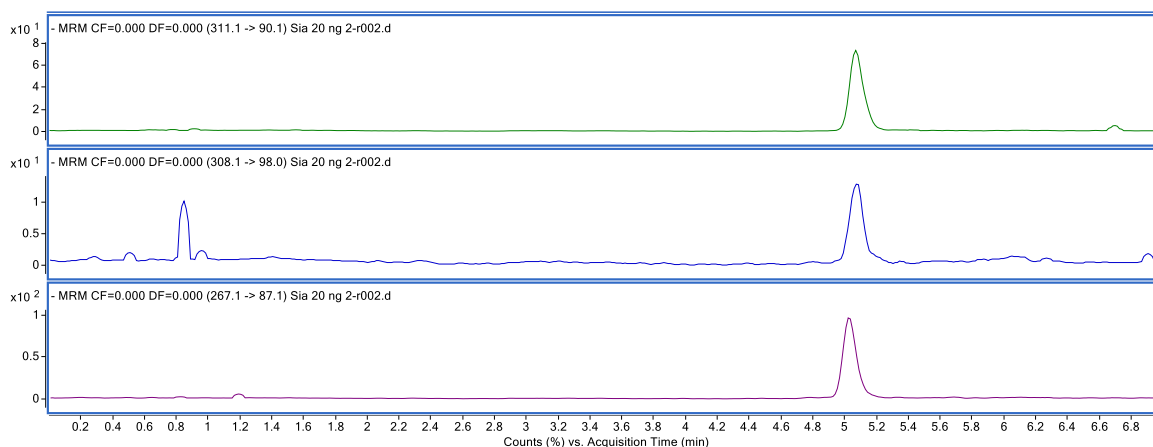


Figura 10. Cromatogramas de HPLC para la cuantificación del contenido de Neu5Ac-D-1,2,3-C13, Neu5Ac, y KDN (20 ng/mL).

La temperatura de la columna se fijó en 30 °C utilizando una columna Accucore HILIC (150 mm × 4,6 mm, 2,6 µm de partículas) conectada con una precolumna Accucore HILIC (10 mm × 4,6 mm, 2,6 µm). El caudal de la fase móvil se ajustó a 0,3 mL/min. La fase móvil consistió en la solución A (10% de formiato de amonio en agua) y la solución B (10% de formiato de amonio en acetonitrilo) con el siguiente protocolo: durante el primer min, 2% B; 1–2 min, gradiente 2–90% B; 2–4 min, 90% B; 4–5 min, gradiente 90–2% B; 5–7 min, 2% B (Tabla 3). Se ejecutó un blanco con agua como control negativo entre cada ciclo estándar o muestra individual. El volumen de inyección para los patrones y las muestras se fijó en 20 µL.

Tabla 3. Perfil de gradiente HPLC para la separación cromatográfica de ácidos siálicos en tejido adiposo

Tiempo	Solvente A	Solvente B	Flujo	Presión
0.00 min	98.0 %	2.0 %	0.300 mL/min	400.00 bar
1.00 min	98.0 %	2.0 %	0.300 mL/min	400.00 bar
2.00 min	10.0 %	90.0 %	0.300 mL/min	400.00 bar
4.00 min	10.0 %	90.0 %	0.300 mL/min	400.00 bar
5.00 min	98.0 %	2.0 %	0.300 mL/min	400.00 bar
7.00 min	98.0 %	2.0 %	0.300 mL/min	400.00 bar

Parámetros operativos del espectrómetro de masas para la detección de monosacáridos en tejido adiposo

La cuantificación de ácidos siálicos a partir de tejido adiposo, incluido el del patrón interno añadido (Neu5Ac-D-1,2,3- $^{13}\text{C}_3$) (IS), se llevó a cabo en modo de ionización por electrospray negativo (ESI) (Figura 11). El voltaje de pulverización de iones funcionó a -4 kV y la temperatura de la fuente fue de 300 °C. El nebulizador se ajustó a 35 psi y el ajuste de flujo de gas fue de 11 L/min. Los iones progenitores $[\text{M}-\text{H}]^-$ cargados individualmente se identificaron para: KDN en m/z 267.1, Neu5Ac en m/z 308.0, y Neu5Ac-D-1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ en m/z 311.1. Los iones hijos seleccionados para KDN, Neu5Ac y Neu5Ac-D-1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ estaban en m/z 87.1, 87.0 y 90.0, respectivamente (Tabla 4). Se utilizó el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM). Las áreas de pico para KDN y Neu5Ac se corrigieron por variaciones en las áreas de pico del IS (Neu5Ac-D-1,2,3- $^{13}\text{C}_3$), seguidas de cálculos de las respectivas concentraciones de ácidos siálicos basadas en las líneas de regresión de los estándares.

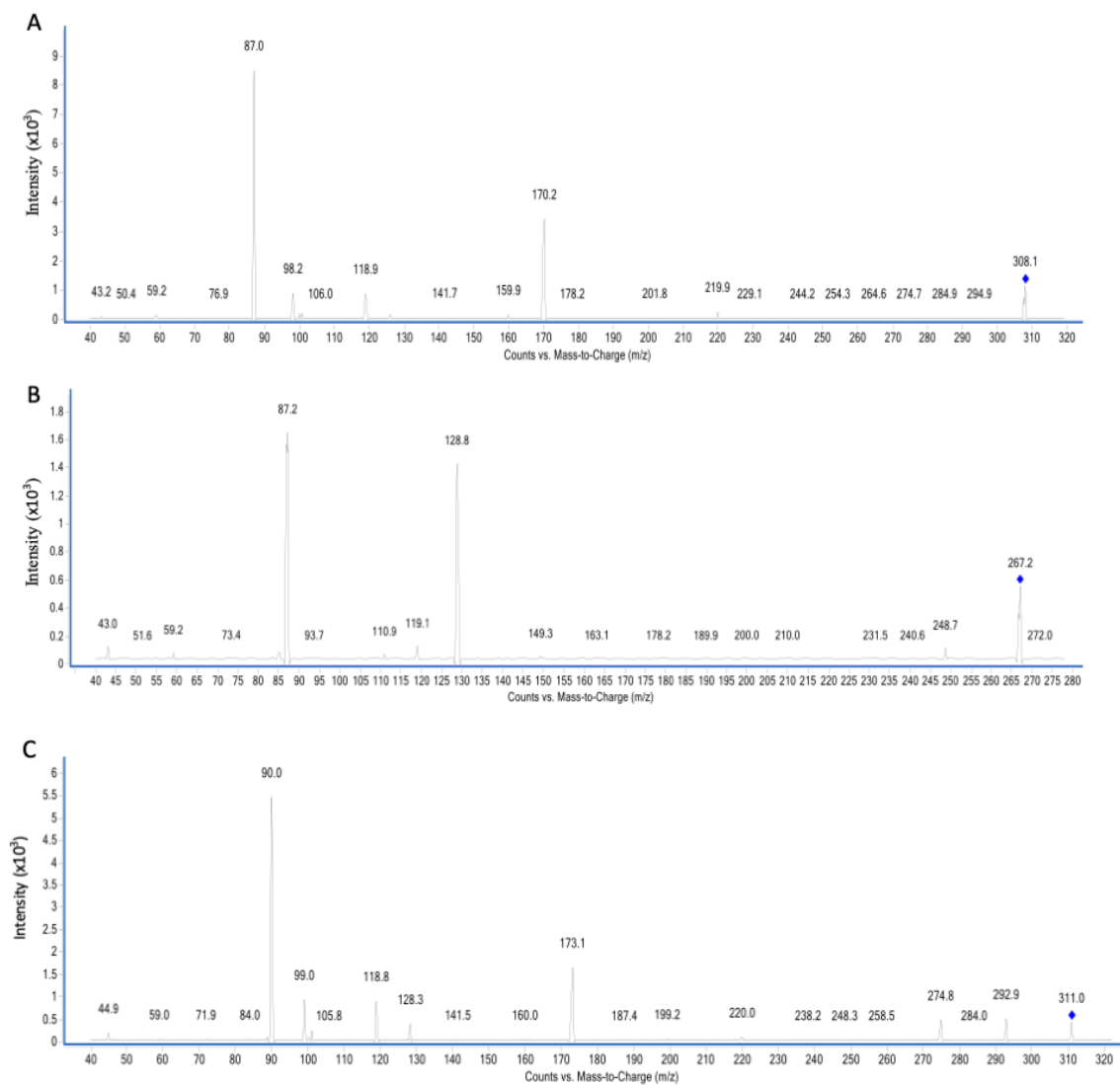


Figura 11. Espectros de masas de electrospray de ionización negativa del ion padre e hijo. A) Neu5Ac a m/z 87.0 con m/z 308.0 como ion padre; B) KDN a m/z 87.2, con m/z 267.2 como ion padre; y C) Neu5Ac-D-1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ a m/z 90.0 con m/z 311.0 como ion padre.

Tabla 4. Parámetros del método LC-MS/MS para la determinación cualitativa y cuantitativa de Neu5Ac, KDN y Neu5Ac-D-1,2,3-¹³C₃ en tejido adiposo

Analito	Tiempo de retención	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	Frag (V)	Energía de colisión (eV)	Transición de cuantificación
Neu5Ac	5.079	308.1	98	100	18	308.1 → 87.0
KDN	5.028	267.1	87.1	90	14	267.1 → 87.2
Neu5Ac-D-1,2,3- ¹³ C ₃	4.994	311.1	90.1	90	12	311.1 → 90.1

Niveles de ácidos siálicos en tejido adiposo animal

Los ácidos siálicos se extrajeron de muestras de tejido adiposo de cerdo, cordero, vaca y pollo. Los ácidos siálicos fueron liberados de los tejidos adiposos y fueron medibles por el método LC-MS/MS (Tabla 5). El tejido adiposo total de ácidos siálicos (µg/mg) fue mayor en cerdo (5,0 µg/mg), seguido de carne de res (3,1 µg/mg), cordero (3,0 µg/mg) y pollo (2,4 µg/mg). Neu5Ac fue la forma principal de ácido siálico en todas las muestras de animales (Tabla 8).

Tabla 5. Contenido de ácidos siálicos totales en el tejido adiposo animal (µg/mg)

Muestra Animal n=3	Neu5Ac		KDN		Total	
	Promedio	±DS	Promedio	±DS	Promedio	±DS
Pollo	2,18	0,37	0,26	0,04	2,44	0,37
Cerdo	4,68	0,39	0,32	0,02	5,00	0,39
Cordero	2,78	0,33	0,28	0,06	3,06	0,34
Res	3,13	0,56	0,11	0,10	3,24	0,57

Niveles de ácidos siálicos en muestras de tejido adiposo humano

Las concentraciones de ácidos siálicos en las muestras se determinaron utilizando curvas de calibración estándar (Figura 12). El peso de las muestras humanas osciló entre 5 y 30 mg, y el de las muestras animales entre 10 y 20 mg, medido mediante una balanza analítica (Mettler-Toledo, AB54-S). Las concentraciones de ácidos siálicos se expresaron en términos relativos al peso de la muestra de tejido adiposo antes de la extracción en (ng ácidos siálicos)/(mg adiposo) o ppm.

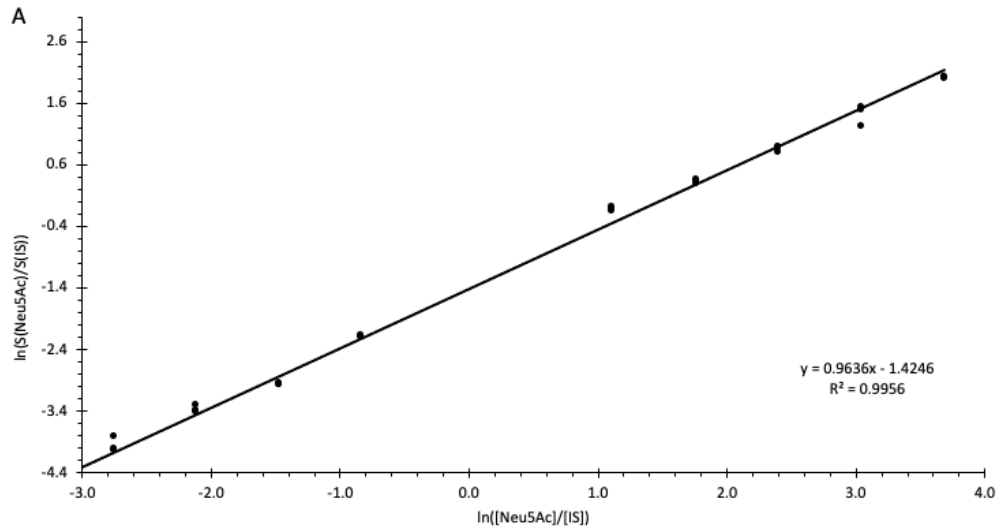
Las líneas estándares se desarrollaron utilizando diferentes concentraciones respectivas de ácidos siálicos en presencia de una concentración fija de 30 ng/mL para el control interno (IS). La linealidad se obtuvo siguiendo las transformaciones logarítmicas naturales de las relaciones de intensidad de la señal del detector del espectrómetro de masa y las relaciones de concentración conocidas, para producir la ecuación (1) en el formato estándar. A continuación, se empleó un reordenamiento, ilustrado por la ecuación (2), para convertir las intensidades de la señal del

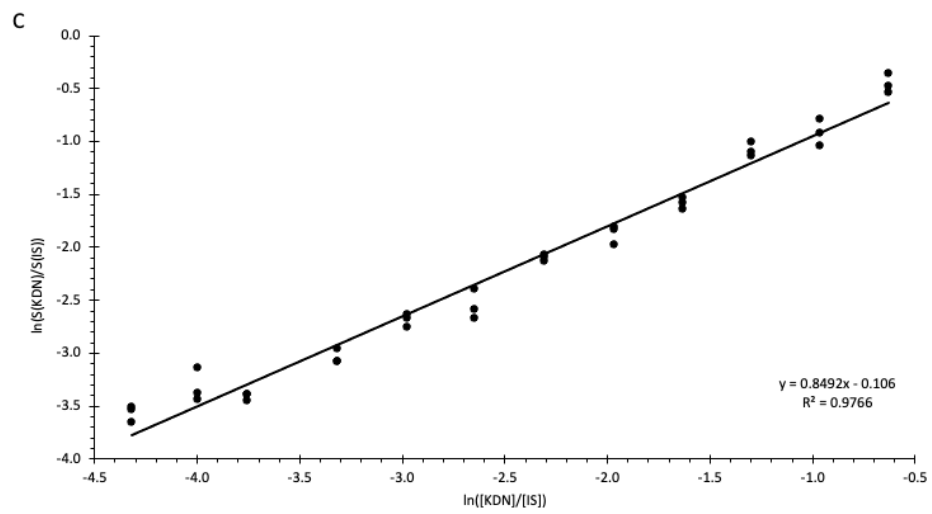
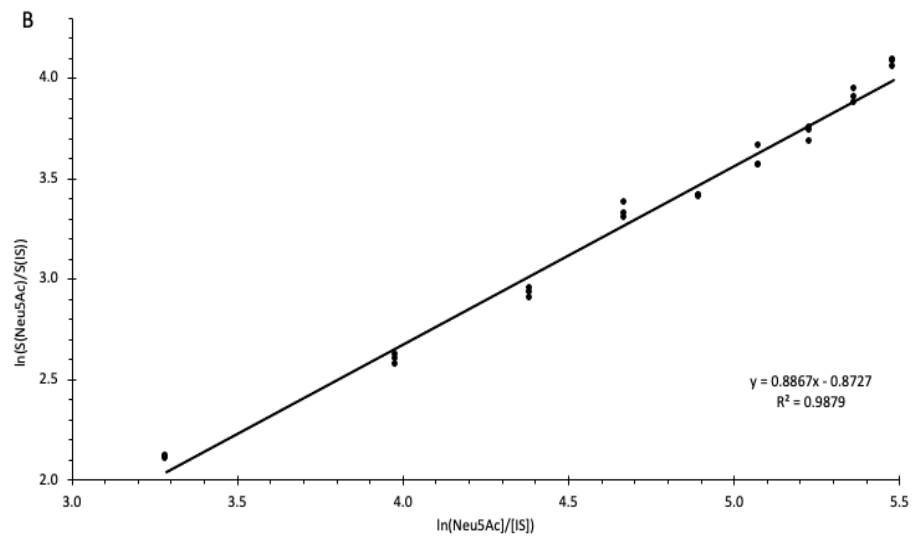
detector del espectrómetro de masa para muestras de ácidos siálicos con IS conocido en concentraciones apropiadas de ácidos siálicos (3), después de tener en cuenta el factor de dilución (DF). Las ecuaciones específicas de la forma (2) para cada ácido siálico se presentan a continuación. Se emplean dos líneas estándar diferentes tanto para Neu5Ac como para las mediciones de KDN, para adaptarse a posibles rangos de concentración bajos y altos.

$$\ln \left(\frac{S(Sia)}{S(IS)} \right) = m * \ln \left(\frac{[Sia]}{[IS]} \right) + b \quad (1)$$

$$\ln \left(\frac{[Sia]}{[IS]} \right) = \left(\frac{1}{m} \right) * \ln \left(\frac{S(Sia)}{S(IS)} \right) - \left(\frac{b}{m} \right) \quad (2)$$

$$[Sia] = DF * [IS] * e^{\ln \left(\frac{[Sia]}{[IS]} \right)} \quad (3)$$





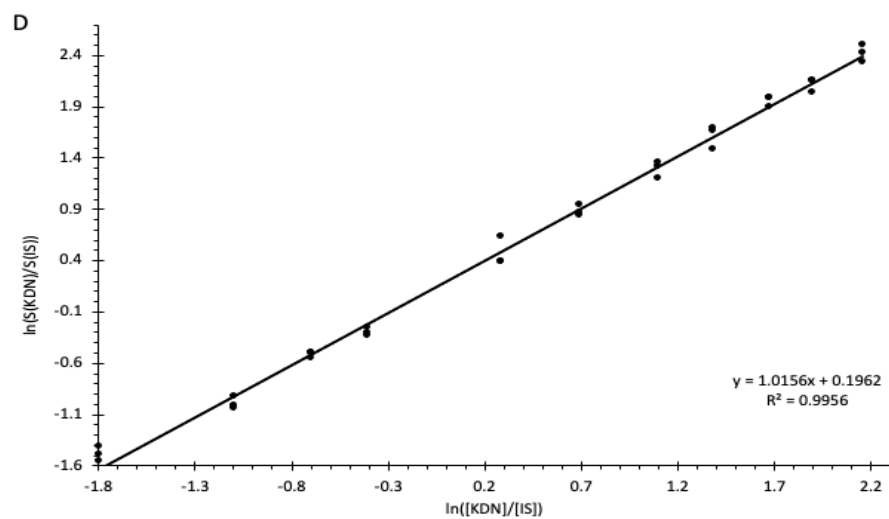


Figura 12. Las curvas estándar para el método LC-MS/MS para la cuantificación de ácidos siálicos en tejido adiposo, en función de las relaciones entre las concentraciones de Neu5Ac (A-B) o KDN (C-D) y la concentración del estándar interno Neu5Ac-D-1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ (IS).

Condiciones del sistema cromatográfico utilizado para la separación de monosacáridos en suero

El ensayo LC-MS/MS, desarrollado de conformidad con las Directrices para métodos bioanalíticos de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) (FDA, 2018), se aplicó a un conjunto de muestras de suero de la AHS-2. La HPLC proporcionó una separación adecuada de ManNAc y Neu5Ac. La fase móvil utilizada en la separación cromatográfica incluyó un gradiente binario. La fase móvil A contenía 10% de NH_4HCO_2 , 0,01% de CH_2O_2 en agua, mientras que la fase móvil B era de 10% NH_4HCO_2 , 0,01% de CH_2O_2 en CH_3CN . El programa de gradiente, con un caudal de 1 mL/min, fue el siguiente: 0-2 minutos, 2% B; 2-5 minutos, gradiente aumentado al 90% B; 5-6 minutos, el gradiente volvió al 2% B (Tabla 1). El eluido de cromatografía se proporcionó al espectrómetro de masas solo durante el rango de tiempo de 1,6 a 2,4 min, que incluye los tiempos de retención de ManNAc y Neu5Ac. De lo contrario, tanto la cabeza como la cola de la serie cromatográfica se desviaron para ser descartados por la válvula de conmutación de 2 posiciones / 6 puertos. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 30 °C. El volumen de inyección para todas las muestras, QC y calibradores se estableció en 5 μL . El muestreador automático de HPLC se controló a temperatura a 4 °C.

Parámetros operativos del espectrómetro de masas para la detección de monosacáridos en suero

Los datos de espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) se combinaron con espectrometría de masas en tándem en modo de iones negativos o positivos. Los datos de espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) se combinaron con espectrometría de masas en tándem en modo de iones negativos o positivos^{463,464}. La cuantificación mediante análisis de monitorización de reacciones múltiples (MRM) se realizó en el modo de iones negativos para Neu5Ac y ácido *N*-acetil-D-[1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]neuramínico, mientras que el análisis para ManNAc y *N*-acetil-D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]manosamina se llevó a cabo en el modo de iones positivos. El voltaje de pulverización de iones se operó a -4 KV y la temperatura de la fuente fue de 300 °C. El nebulizador se configuró a 35 psi y la configuración del flujo de gas fue de 11 L/min. Se eligió el ESI-MS de iones padres e hijos, para Neu5Ac, ácido *N*-acetil-D-[1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]neuramínico, ManNAc y *N*-acetil-D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]manosamina debido a su abundancia relativa^{357,463,464}. Los iones parentales $[\text{M}-\text{H}]^-$ o $[\text{M}+\text{H}]^+$ cargados individualmente se identificaron para: Neu5Ac a m/z 308.0, KDN a 267.1, *N*-acetil-D-[1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]ácido neuramínico a m/z 311.1,

ManNAc a m/z 222 y N-acetil-D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]manosamina a m/z 228. Los iones hijos seleccionados para Neu5Ac, KDN, ácido N-acetil-D-[1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]neuramínico, ManNAc y N-acetil-D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]manosamina estaban en m/z 87.1, 129.0, 90.1, 84.1 y 130.1, respectivamente (Tabla 6, Figura 13).

Tabla 6. Transiciones de monitoreo de reacciones múltiples para ManNAc y Neu5Ac

Compuesto	Ion precursor		Ion producto	EC
	(m/z)		(m/z)	(eV)
ManNAc	222	→	84.1	22
N-acetyl-D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]mannosamine	228	→	130	8
Neu5Ac	308.1	→	87.1	18
N-acetyl-D-[1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]neuraminic acid	311.1	→	90.1	12
KDN	267.1	→	129	14

EC= energía de colisión; eV= voltios de electrón.

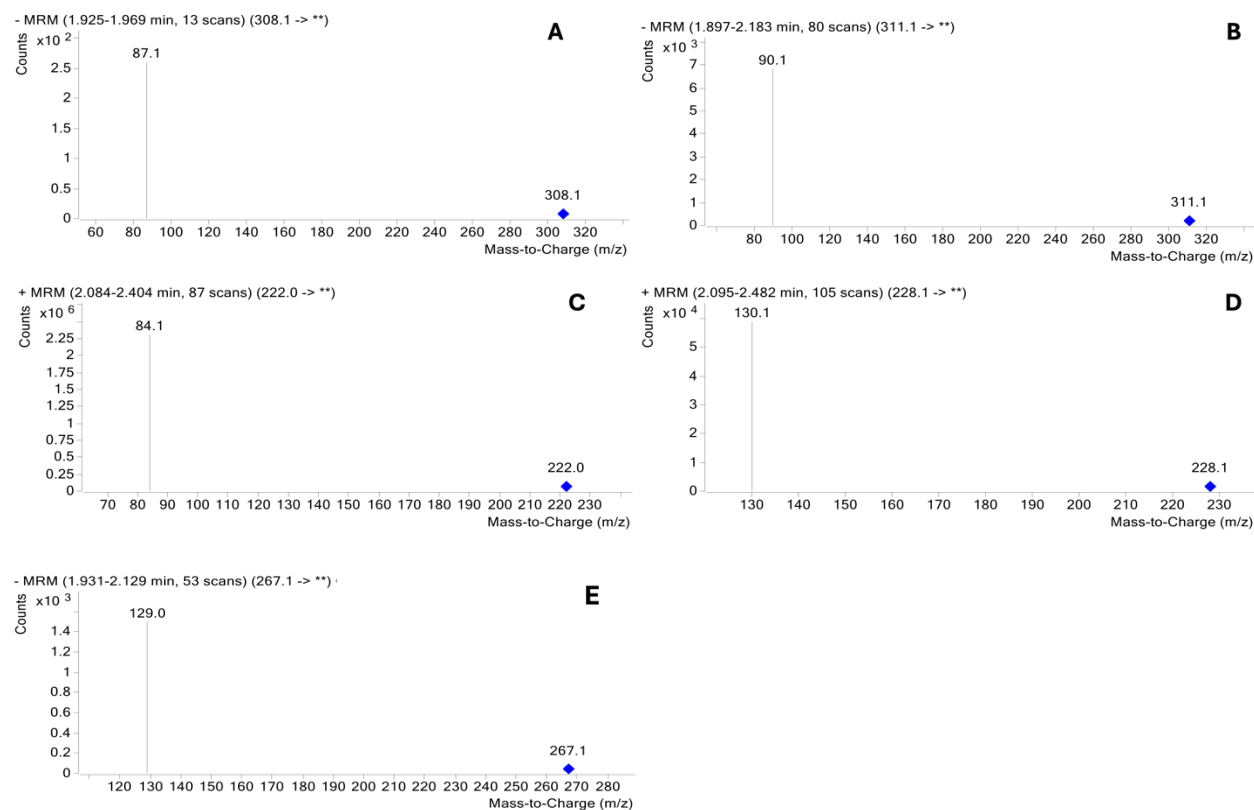


Figura 13. Espectros de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) de la exploración hija. **A.** Neu5Ac en m/z 87.1, con m/z 308.1 como ion padre; **B.** Ácido *N*-acetil-D-[1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]neuramínico a m/z 90.1, con m/z 311.1 como ion padre; **C.** ManNAc a m/z 84.1, con m/z 222.0 como ion padre, *N*-acetil-D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]manosamina a m/z 130.1; **D.** con m/z 228.1 como ion padre. **E.** KDN en m/z 129.0, con m/z 267.1 como ion padre.

Niveles de monosacáridos en muestras de suero

La línea de calibración ManNAc se construyó utilizando siete soluciones estándar preparadas en agua ultrapura: 5, 16, 50, 158, 500, 1581 y 5000 ng/mL. Para Neu5Ac, se prepararon dos líneas de calibración distintas: (1) Rango bajo: 5, 10, 20, 39, 77, 152 y 300 ng/mL y (2) Rango alto: 150, 277, 513, 949, 1754, 3244 y 6000 ng/mL. Para KDN, la curva de calibración se construyó a partir de las siguientes concentraciones: 5, 10, 20, 39, 77, 152 y 300 ng/mL. Las áreas de pico para ManNAc, KDN o Neu5Ac se corrigieron mediante las áreas de pico de los estándares internos *N*-acetil-D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]manosamina y *N*-acetil-D-[1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]ácido neuramínico, respectivamente. Los valores de r^2 de ManNAc, KDN y Neu5Ac fueron $> 0,996$, como se muestra en la Figura 14, lo que indica linealidad y sensibilidad suficientes para la cuantificación y resultados de validación favorables (Tablas 7 y 8). La linealidad se evaluó calculando el coeficiente de correlación de las líneas de calibración.

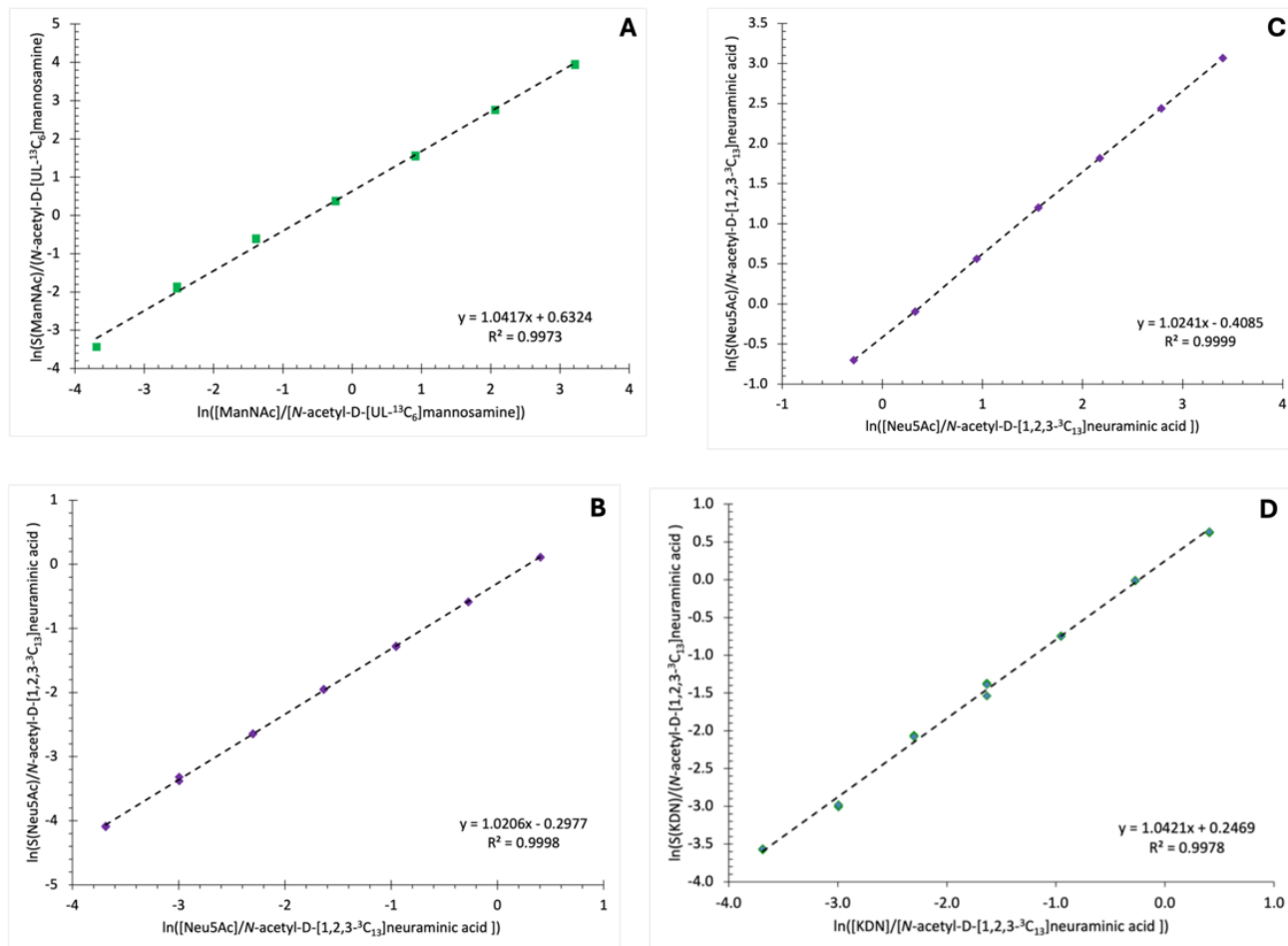


Figura 14. La linealidad del ensayo de monosacáridos. Las curvas de calibración cuantitativas muestran la linealidad y sensibilidad del método LC-MS/MS para la respuesta del detector en función de las concentraciones de ManNAc libre y total y Neu5Ac. Los límites inferiores de detección y cuantificación de Neu5Ac fueron 1,14 ng/ml y 3,82 ng/mL. Para ManNAc, los límites de detección y cuantificación fueron 1,02 y 3,41, respectivamente. Ambos demuestran la sensibilidad cuantitativa y la solidez del método. En el caso de KDN, 0,58 y 1,94. A. Curva de calibración para ManNAc. $x = \ln\left(\frac{[\text{ManNAc}]}{[\text{ManNAc}(IS)]}\right)$, $y = \ln\left(\frac{S(\text{ManNAc})}{S(\text{ManNAc}(IS))}\right)$. B. Curva de calibración de Neu5Ac (rango bajo). $x = \ln\left(\frac{[\text{Neu5Ac}]}{[\text{Neu5Ac}(IS)]}\right)$, $y = \ln\left(\frac{S(\text{Neu5Ac})}{S(\text{Neu5Ac}(IS))}\right)$. C. Curva de calibración de Neu5Ac (rango alto). $x = \ln\left(\frac{[\text{Neu5Ac}]}{[\text{Neu5Ac}(IS)]}\right)$, $y = \ln\left(\frac{S(\text{Neu5Ac})}{S(\text{Neu5Ac}(IS))}\right)$ y D. Curva de calibración para KDN $x = \ln\left(\frac{[\text{KDN}]}{[\text{Neu5Ac}(IS)]}\right)$, $y = \ln\left(\frac{S(\text{KDN})}{S(\text{Neu5Ac}(IS))}\right)$. Los coeficientes de correlación (r^2) para ManNAc, KDN y Neu5Ac son > 0.997 .

Validación del método LC-MS/MS para ManNAc, KDN y Neu5Ac séricos

El límite instrumental de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se calcularon utilizando parámetros de linealidad: desviación estándar de la respuesta en blanco (σ) y la

pendiente de la línea estándar (S), de modo que x_i = medición_i, μ = media y N = número de mediciones ⁴⁶⁵:

$$LoD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

$$LoQ = \frac{10\sigma}{S}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \mu)^2}{N}}$$

El LOQ, el LOD, la linealidad, la exactitud (recuperación) y la precisión (intraensayo/interensayo) se calcularon y presentaron en las Tablas 7 y 8. Se monitorizaron los tiempos de retención cromatográfica de cada compuesto para asegurar su reproducibilidad entre muestras (Tabla 8, Figura 15). Se prepararon tres soluciones de control de calidad mediante dilución acuosa de la solución madre de ManNAc para obtener 250 (QC1), 1000 (QC2) y 4000 (QC3) ng/mL, y se ejecutaron a través del LC-MS/MS para evaluar la variabilidad intra-ensayo e inter-ensayo. Del mismo modo, se prepararon tres soluciones de control de Neu5Ac, cada una para rangos de concentración bajos y altos, respectivamente: 15 (QC1), 60 (QC2), 240 (QC3) o 300 (QC1), 1200 (QC2) y 4800 (QC3) ng/mL; y para KDN, 15 (QC1), 60 (QC2) y 240 ng/mL (QC3), para evaluaciones de variabilidad análogas. Para cada uno de estos, se derivaron las líneas de regresión y se presentaron en la Tabla 7.

Tabla 7. Ensayo de validación

Compuesto	Tiempo de retención (n=21)	Curva de calibración	Coefficiente de correlación (R ²)	Rango de concentración (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Neu5Ac	2.00 ± 0.006	y=1.0206x - 0.2977	0.99980	5–300	1.149	3.829
Neu5Ac	2.00 ± 0.006	y=1.0241x - 0.4085	0.99992	150–6000	0.582	1.949
KDN	1.98 ± 0.007	y=1.0421x - 0.2469	0.99780	5–300	0.582	1.940
ManNAc	2.21 ± 0.011	y=1.0417x - 0.6324	0.99727	5–5000	1.025	3.417

LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación. ¹ $x = \ln\left(\frac{[ManNAc]}{[ManNAc(1S)]}\right)$, $y = \ln\left(\frac{S(ManNAc)}{S(ManNAc(1S))}\right)$.

² $x = \ln\left(\frac{[Neu5Ac]}{[Neu5Ac(1S)]}\right)$, $y = \ln\left(\frac{S(Neu5Ac)}{S(Neu5Ac(1S))}\right)$.

Tabla 8. Intra e inter-ensayo de precisión para la medición de Neu5Ac, KDN y ManNAc

Compuesto	QC	Conc.	Intra M ± DS	Intra CV	Intra Ex	Inter M ± DS	Inter CV	Inter Ex
Neu5Ac bajo	Bajo	15	14.50 ± 0.09	0.64	96.6	15.30 ± 0.16	1.07	101.98
Neu5Ac bajo	Medio	60	59.18 ± 0.27	0.46	99.3	61.22 ± 0.88	1.44	102.04
Neu5Ac bajo	Alto	240	240.53 ± 0.39	0.16	100.2	242.39 ± 3.70	1.53	100.99
Neu5Ac alto	Bajo	300	283.31 ± 0.88	0.31	94.4	294.01 ± 3.75	1.27	98.00
Neu5Ac alto	Medio	1200	1159.02 ± 2.13	0.18	96.6	1156.26 ± 1.03	0.09	96.35
Neu5Ac alto	Alto	4800	5025.45 ± 2.67	0.05	104.7	4802.03 ± 0.19	0.00	100.04
KDN	Bajo	15	15.52 ± 0.70	4.51	103.48	14.47 ± 0.06	0.39	96.43
KDN	Medio	60	56.56 ± 0.25	0.45	94.27	59.09 ± 0.09	0.16	98.48
KDN	Alto	240	260.37 ± 2.26	0.87	108.49	272.48 ± 0.79	0.29	113.53
ManNAc	Bajo	250	242.80 ± 2.25	0.93	97.12	205.27 ± 2.09	1.02	82.11
ManNAc	Medio	1000	952.04 ± 4.02	0.42	95.20	810.17 ± 3.68	0.45	81.02
ManNAc	Alto	4000	3975.31 ± 3.71	0.09	99.93	3436.74 ± 2.96	0.09	84.70

QC, control de calidad; Conc., concentración nominal (ng/mL); M ± DS, media ± desviación estándar (ng/mL); Intra, intra-ensayo; Inter, inter-ensayo; CV, coeficiente de variación (%); Ex, exactitud (%).

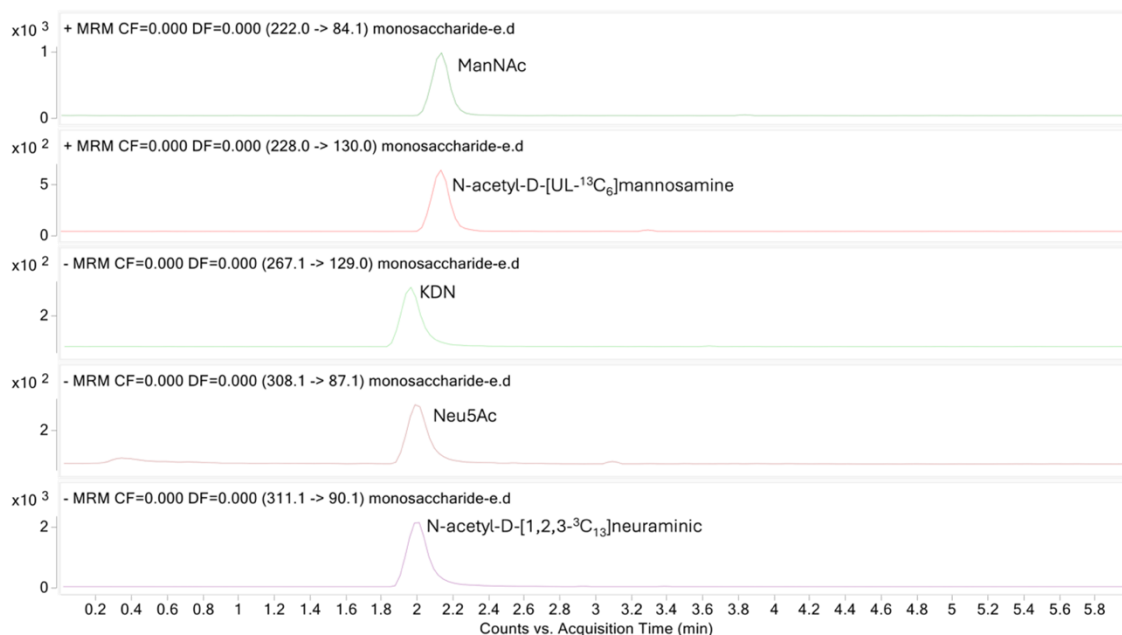


Figura 15. Cromatogramas que muestran señales de ManNAc, *N*-acetil-D-[UL-¹³C₆]manosamina, KDN, Neu5Ac y *N*-acetil-D-[1,2,3-¹³C₁₃]ácido neuramínico y los picos de HPLC en LC-MS/MS, 100 ng/mL cada uno.

5.3 Objetivo específico 3

Cuantificar las concentraciones de KDN y Neu5Ac en muestras de tejido adiposo, y de KDN, Neu5Ac y ManNAc en suero de participantes del AHS-2, y comparar sus niveles entre individuos que siguen patrones dietéticos habituales, vegetarianos u omnívoros a largo plazo, así como entre grupos raciales.

Características de la población incluida en los análisis de tejido adiposo y suero

Las características de la población de estudio en términos de dieta se presentan en la Tabla 9. La cohorte del estudio incluyó 156 participantes distribuidos entre grupos dietéticos veganos, ovolactovegetarianos y omnívoros. Se observaron algunas diferencias entre grupos dietéticos. Una proporción significativamente menor de participantes negros eran veganos ($p = 0,0007$). En comparación con otros grupos dietéticos, los veganos tenían un IMC medio significativamente más bajo ($p = 0,004$) y un Neu5Ac adiposo significativamente más alto ($p = 0,02$) considerando las medias no ajustadas.

Tabla 9. Características demográficas de la población estudio¹

	Vegano	Lacto-ovo	Omnívoro	<i>p</i> ²
Participantes	52 (33,3)	56 (35,8)	48 (30,7)	
Edad (años)	61,3 (14,2)	58,1 (13,3)	60,8 (14,0)	0,45
Sexo				
Femenino	35 (31,8)	40 (36,3)	35 (31,8)	
Masculino	17 (36,9)	16 (34,7)	13 (28,2)	0,81
Raza				
Negro	23 (22,7)	41 (40,5)	37 (36,6)	
Blanco	29 (52,7)	15 (27,2)	11 (20,0)	0,0007
IMC (kg/m ²)	27,5 (5,4)	31,2 (7,5)	31,6 (7,4)	0,004
KDN (ng/mg)*	1,4 (0,91)	1,6 (1,5)	1,04 (1,06)	0,083
Neu5Ac (ng/mg)*	40,2 (38,9)	36,5 (46,4)	20,6 (21,7)	0,024

¹ Los valores se presentan como n (%) o media (DE). ² El valor de p fue calculado mediante la prueba de chi-cuadrado para variables categóricas y ANOVA para variables continuas.* Ácidos siálicos derivados de tejido adiposo.

En el conjunto de muestras de suero analizadas categorizadas por raza, algunos participantes presentaron enfermedades crónicas, particularmente, enfermedad cardiovascular (ECV; infarto de miocardio, enfermedad de las arterias coronarias, cirugía de bypass, angina o insuficiencia cardíaca): 2 negros y 2 blancos; diabetes, 7 negros y 1 blanco; e hipertensión, 10 negros y 2 blancos (Tabla 10).

Tabla 10. Características sociodemográficas de la población estudiada por raza¹

	Negro	Blanco	<i>p</i>
Participantes	102	53	
Edad	56,2 (13,0)	67 (12,7)	<0,001
Mujer	74 (73,0)	35 (66,0)	
Hombre	28 (27,4)	18 (33,0)	0,512
IMC (Kg/m ²)	31,1 (7,2)	28,4 (6,2)	0,025
Muestras de suero			
Neu5Ac _{Libre} (ng/mL)	594 (421,0)	439 (168,0)	0,028
Neu5Ac _{Conj} (μg/mL)	35,11 (9,4)	33 (9,5)	0,110
Neu5Ac _{Total} (μg/mL)	35,69 (9,4)	33,44 (9,5)	0,096
ManNAc _{Libre} (ng/mL)	93,1 (36,2)	89 (20,2)	0,947
ManNAc _{Conj} (μg/mL)	1,80 (0,8)	1,31 (0,5)	<0,001
ManNAc _{Total} (μg/mL)	1,90 (0,8)	1,40 (0,5)	<0,001
KDN _{Libre} (ng/mL)	20 (35,2)	31 (42,3)	0,057
ECV	2 (1,9)	2 (3,8)	0,887
Diabetes	7 (6,8)	1 (1,9)	0,344
Hipertensión	10 (9,8)	2 (3,8)	0,309
Dieta			
Vegano	22 (21,6)	27 (50,9)	
Lacto-ovo	40 (39,2)	15 (28,3)	0,001*
Omnívoro	40 (39,2)	11 (20,8)	

Los valores se presentan como media (DE) o recuento (%). ¹Valores de *p* calculados mediante la prueba U de Mann-Whitney para variables continuas y la prueba de chi-cuadrado para variables categóricas.*Existe una diferencia estadísticamente significativa en la distribución del tipo de dieta entre los participantes negros y blancos.

5.4 Objetivo específico 4

Investigar las asociaciones entre las características demográficas e índice de masa corporal de participantes sanos en la cohorte del AHS-2 en relación con las concentraciones de KDN y Neu5Ac en tejido adiposo y KDN, Neu5Ac y ManNAc en suero.

Asociaciones de los ácidos siálicos del tejido adiposo humano con los patrones dietéticos y el IMC

Se midieron y cuantificaron Neu5Ac y KDN en muestras de tejido adiposo de veganos, lacto-ovo-vegetarianos y omnívoros, como se describe. Estas concentraciones de ácidos siálicos (ng/mg) se compararon entre los grupos de dieta mediante análisis de regresión lineal y se obtuvieron medias ajustadas (Tabla 11). Neu5Ac fue significativamente mayor en los tejidos adiposos de los veganos (media: 17,1, IC del 95%: 12,5-23,6) en comparación con los omnívoros (media: 9,8, IC del 95%: 7,1-13,7). Del mismo modo, el Neu5Ac fue mayor en el adiposo de los lacto-ovo-vegetarianos (media: 12,7, IC del 95%: 9,2-17,5) en comparación con los omnívoros (media: 7,7, IC del 95%: 5,4-10,8). Estas medias fueron estadísticamente diferentes ($p = 0,01$ y $p = 0,02$, respectivamente), incluso después de incluir el IMC como covariable. Las concentraciones de KDN fueron más altas en los veganos y los lacto-ovo-vegetarianos en comparación con los omnívoros, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además, la regresión lineal reveló una asociación inversa entre el IMC y la KDN ($p = 0,02$), independientemente del grupo de dieta (Tabla 12).

Tabla 11. Medias ajustadas a partir de un modelo de regresión lineal de asociaciones de patrones dietéticos con Neu5Ac y KDN1 en tejido adiposo

		Modelo 1 ^a			Modelo 2 ^b		
		Vegano	Omnívoro	<i>p</i>	Vegano	Omnívoro	<i>p</i>
Neu5Ac		17,13 (12,45, 23,58)	9,84 (7,09, 13,67)	0,01	17,55 (12,67, 24,30)	9,70 (6,96, 13,51)	0,01
KDN		0,79 (0,63, 0,99)	0,63 (0,50, 0,79)	0,15	0,78 (0,62, 0,98)	0,63 (0,50, 0,80)	0,19
		Vegano	Lacto-ovo	<i>p</i>	Vegano	Lacto-ovo	<i>p</i>
Neu5Ac		16,97 (12,08, 23,84)	15,20 (10,97, 21,06)	0,46	16,97 (12,08, 23,84)	16,44 (11,92, 22,69)	0,88
KDN		0,80 (0,62, 1,02)	0,82 (0,63, 1,07)	0,85	0,79 (0,61, 1,03)	0,85 (0,66, 1,09)	0,66
		Lacto-ovo	Omnívoro	<i>p</i>	Lacto-ovo	Omnívoro	<i>p</i>
Neu5Ac		12,71 (9,23, 17,49)	7,65 (5,40, 10,83)	0,02	12,55 (9,13, 17,24)	7,62 (5,39, 10,76)	0,02
KDN		0,74 (0,56, 0,97)	0,54 (0,40, 0,74)	0,1	0,73 (0,55, 0,95)	0,54 (0,40, 0,73)	0,11

IMC: índice de masa corporal. ¹Medias marginales estimadas (mínimos cuadrados) (ng/mg) e intervalos de confianza del 95% obtenidos a partir de la regresión lineal. ^aAjustado por edad en el momento de la extracción de sangre, raza, y sexo. ^bAjustado para las covariables en el modelo 1, además del IMC.

Tabla 12. Asociaciones de IMC con KDN y Neu5Ac¹

	Modelo 1 ²			Modelo 2 ³		
	coeficiente β	Err. Std.	p	coeficiente β	Err. Std.	p
KDN	-0,023	0,009	0,013	-0,020	0,009	0,02
Neu5Ac	-0,020	0,01	0,09	-0,016	0,012	0,18

IMC: índice de masa corporal. ¹Los coeficientes beta se obtienen a partir de la regresión lineal y representan el cambio en las concentraciones de ácido siálico por unidad de aumento en el IMC. ²Ajustado por raza, sexo, edad en el momento de la extracción de sangre y lote. ³Se ha ajustado para las covariables del modelo 1 además del grupo de dieta.

Asociación de ManNAc, KDN y Neu5Ac en muestras de suero con variables sociodemográficas e IMC

La información sociodemográfica, el tipo de dieta y el índice de masa corporal (IMC) se obtuvieron del cuestionario inicial. ManNAc, KDN y Neu5Ac se midieron y cuantificaron en muestras de suero humano (Tabla 10). Además, estas concentraciones de monosacáridos (ng/mL) se compararon entre los miembros de la cohorte de negros y blancos mediante análisis de regresión lineal y medias ajustadas (Tabla 13). Las concentraciones de ManNAc conjugadas y totales fueron más altas en sujetos negros en comparación con blancos, β : 0,296, IC 95%: 0,140, 0,440 y β : 0,285, IC 95%: 0,140, 0,430, ambos con $p = <0,001$ (Figura 17, paneles D y E). Además, la regresión lineal revela una asociación directa significativa entre el IMC y el ManNAc libre, β : 0,006 ng/mL, IC 95%: 0,000, 0,013, $p = 0,040$ (Figura 17, panel A). De igual manera, se observó una asociación significativa directa de edad con ManNAc libre o total, β : 1.070 ng/mL, IC 95%: 1,030, 1,100 y β : 0,004 ng/mL, IC 95%: 0,0002, 0,0096 (Figura 17, paneles B y C), $p < 0,001$ y $p = 0,045$, respectivamente. Además, el Neu5Ac conjugado y total es significativamente mayor en muestras de suero de mujeres, β : -0,106 ng/mL, IC del 95%: -0,200, -0,010 y β : -0,107 ng/mL, IC del 95%: -0,200, -0,010; $p = 0,029$ y $p = 0,026$, respectivamente (Figura 17, paneles F y G). Con una tendencia modestamente significativa, los participantes blancos tienen mayor concentración de KDN ($p = 0,057$; Tabla 10); sin embargo, tras el ajuste en los distintos modelos estadísticos empleados no se observaron asociaciones significativas con las variables estudiadas. Además, no se encontró asociación entre los monosacáridos estudiados en muestras de suero y el tipo de dieta (Tabla 14).

Tabla 13. Asociación de IMC, sexo, raza y edad con Neu5Ac, ManNAc y KDN. Los coeficientes beta obtenidos de la regresión lineal representan un cambio en la concentración de Neu5Ac, ManNAc y KDN de acuerdo con la variable predicha. Todas las variables predictoras se ajustaron por tipos de dieta

Compuesto	IMC		Sexo		Raza		Edad*	
	β coeficiente (95% CI)	<i>p</i>	β coeficiente (95% CI)	<i>p</i>	β coeficiente (95% CI)	<i>p</i>	β coeficiente (95% CI)	<i>p</i>
Neu5Ac _{libre}	0,006 (-0,004, 0,017)	0,242	-0,073 (-0,230, 0,080)	0,365	0,163 (-0,010, 0,330)	0,069	0,985 (0.930, 1,040)	0,523
Neu5Ac _{conj}	0,002 (-0,004, 0,009)	0,448	-0,106 (-0,200, -0,010)	0,029	0,053 (-0,050, 0,150)	0,317	-0,001 (-0.004, 0,002)	0,597
Neu5Ac _{total}	0,002 (-0,003, 0,009)	0,422	-0,107 (-0,200, -0,010)	0,026	0,055 (-0,040, 0,160)	0,290	-0,001 (-0.004, 0,002)	0,580
ManNAc _{libre}	0,006 (0,000, 0,013)	0,040	-0,037 (-0,131, 0,050)	0,435	0,071 (-0,030, 0,170)	0,178	1,070 (1.030, 1,100)	<0,001
ManNAc _{conj}	0,008 (-0,008, 0,010)	0,859	-0,103 (-0,240, 0,030)	0,142	0,296 (0,140, 0,440)	<0,001	0,004 (-0.0001, 0,009)	0,057
ManNAc _{total}	0,001 (-0,007, 0,010)	0,793	0,001 (-0,007, 0,010)	0,793	0,285 (0,140, 0,430)	<0,001	0,004 (0.0002, 0,0096)	0,045
KDN	-0.025 (-0,055, 0,0038)	0,087	-0,053 (-0,477, 0,371)	0,805	-0.115 (-0,582, 0,351)	0,626	-0,014 (-0,029, 0,000)	0,063

* Los coeficientes beta para la edad y los IC se convirtieron en una métrica de edad de 10 años. Así, por ejemplo, el ManNAc libre aumentó un 7% en una década. (Aumento porcentual = 1,07-1) * 100. IMC, índice de masa corporal. Sexo, hombres en comparación con mujeres. Raza, negro en comparación con blanco. Los límites de CI se presentan con 4 decimales cuando es necesario para reflejar valores cercanos a 0.

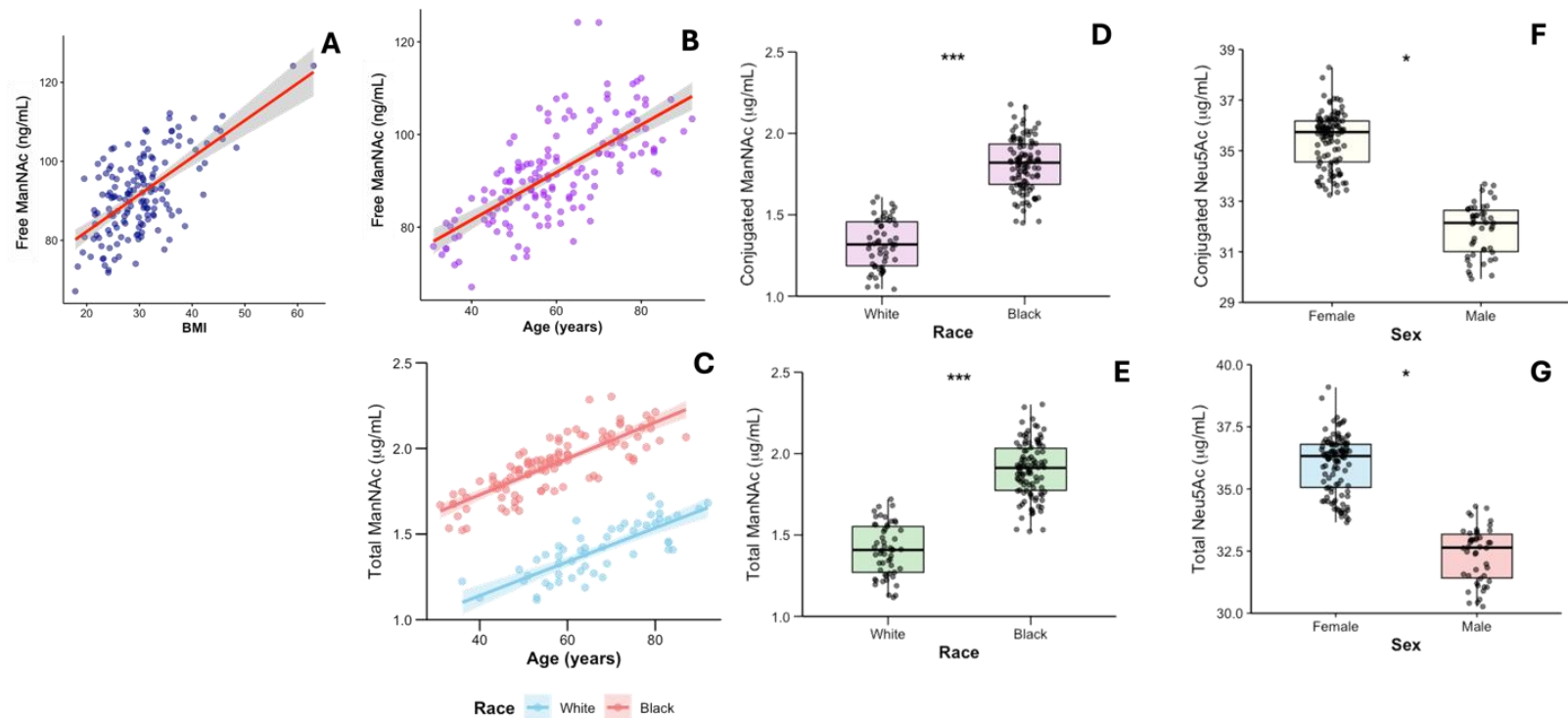


Figura 17. La concentración de ManNAc y Neu5Ac en muestras de suero. **A)** Asociación de ManNAc libre con IMC, ajustado por edad, raza y sexo ($p = 0,040$); **B)** Asociación entre la concentración libre de ManNAc y la edad, ajustada por IMC, raza y sexo ($p < 0,001$); **C)** Asociación entre ManNAc total y edad, ajustada por IMC, raza y sexo ($p = 0,045$); **D)** Asociación entre ManNAc conjugado y raza, ajustado por edad, IMC y sexo ($p = <0,001$); **E)** Asociación del ManNAc total con la raza, ajustado por edad, IMC y sexo ($p < 0,001$); **F)** Asociación de Neu5Ac sérico conjugado con el sexo, ajustado por edad, IMC y raza ($p = 0,029$); **G)** Asociación del Neu5Ac total con el sexo, ajustado por edad, IMC y raza ($p = 0,026$). La forma conjugada denota la presencia de Neu5Ac como monosacárido terminal en los extremos de oligosacáridos libres, cadenas de glicano glicolípido y cadenas de glicanos de glicoproteína. La presencia de ManNAc como conjugado de lípidos o moléculas de proteínas aún no se ha dilucidado; sin embargo, al igual que los otros azúcares acetamidos (GlcNAc y GalNAc), este azúcar puede ocupar diversas posiciones dentro de la estructura del glicano, modulando así sus atributos y funcionalidades.

Tabla 14. Medias marginales ajustadas (IC del 95%) de ManNAc, Neu5Ac (libre, conjugado y total) y KDN por tipos de dieta (vegano, lacto-ovo y omnívoro) en modelos de regresión lineal, ajustados por edad, IMC, sexo y raza

Compuesto	Comparación tipo dietario	Radio, ng/mL (95% IC)	<i>p</i>
Neu5Acfree	Vegano vs Omnívoro	1,018 (0,80, 1,28)	0,98
	Vegano vs Lacto-ovo	0,999 (0,79, 1,24)	0,99
	Omnívoro vs Lacto-ovo	1,019 (0,82, 1,26)	0,97
Neu5Acconj	Vegano vs Omnívoro	-0,034 (-0,14, 0,07)	0,54
	Vegano vs Lacto-ovo	0,011 (-0,09, 0,11)	0,83
	Omnívoro vs Lacto-ovo	0,046 (-0,07, 0,16)	0,43
Neu5Actotal	Vegano vs Omnívoro	-0,033 (-0,14, 0,07)	0,53
	Vegano vs Lacto-ovo	0,011 (-0,09, 0,11)	0,82
	Omnívoro vs Lacto-ovo	0,045 (-0,07, 0,16)	0,44
ManNAcfree	Vegano vs Omnívoro	1,042 (0,90, 1,19)	0,75
	Vegano vs Lacto-ovo	1,005 (0,88, 1,14)	0,99
	Omnívoro vs Lacto-ovo	1,036 (0,91, 1,17)	0,77
ManNAcconj	Vegano vs Omnívoro	0,133 (-0,02, 0,29)	0,10
	Vegano vs Lacto-ovo	0,010 (-0,14, 0,16)	0,89
	Omnívoro vs Lacto-ovo	-0,123 (-0,29, 0,04)	0,15
ManNActotal	Vegano vs Omnívoro	0,123 (-0,03, 0,27)	0,11
	Vegano vs Lacto-ovo	0,011 (-0,13, 0,15)	0,87
	Omnívoro vs Lacto-ovo	-0,112 (-0,27, 0,04)	0,17
KDN	Vegano vs Omnívoro	0,319 (-0,30, 0,93)	0,44
	Vegano vs Lacto-ovo	0,524 (-0,03, 1,08)	0,07
	Omnívoro vs Lacto-ovo	-0,205 (-0,79, 0,38)	0,69

IC: intervalo de confianza; IMC: índice de masa corporal.

De manera exploratoria se evaluaron posibles diferencias en las concentraciones de los monosacáridos entre grupos con o sin enfermedad mediante el test de Mann-Whitney. La forma libre y conjugada, así como el total de ManNAc, fueron significativamente mayores en participantes con ECV en comparación con aquellos sin ECV ($p= 0,05$, $0,04$ y $0,04$, respectivamente) (Tabla 15). Las concentraciones de KDN fueron mayores en participantes diabéticos en comparación con participantes sanos ($p= 0,016$). Asimismo, las concentraciones de Neu5Ac conjugado y total fueron mayores en participantes con hipertensión en comparación con los participantes sanos ($p= 0,01$ en ambos casos) (Tabla 15). No obstante, al ajustar por posibles factores de confusión, incluyendo tipo de dieta, IMC, edad, raza y sexo, mediante modelos de

regresión logística y lineal (Tablas 16 y 17), las asociaciones observadas en el análisis no ajustado no se mantuvieron con la misma magnitud ni significación estadística, sugiriendo que el efecto observado podría estar mediado o explicado por dichas variables.

Tabla 15. Resultados de la prueba de Mann-Whitney comparando las concentraciones de monosacáridos por estado de enfermedad en participantes de AHS-2

Enfermedad	Grupo	Compuesto	Mediana (IQR)	<i>p</i>
ECV	Sin ECV	Neu5Ac _{libre}	426.2 (358.8–562)	0.98
	ECV		419 (386.6–480)	
	Sin ECV	Neu5Ac _{conj}	33285.7 (26499.5–40847.2)	0.52
	ECV		35330.8 (31539–41807.9)	
	Sin ECV	Neu5Ac _{total}	34345.1 (27026.8–41280.2)	0.53
	ECV		35725.3 (31901.1–42288)	
	Sin ECV	ManNAc _{free}	85 (73.2–102.8)	0.05
	ECV		105.3 (102.3–110.8)	
Diabetes	Sin ECV	ManNAc _{conj}	1418.9 (1153.4–1933.8)	0.04
	ECV		2183.2 (1987.2–2387.2)	
	Sin ECV	ManNAc _{total}	1511.7 (1230.9–2049)	0.04
	ECV		2294.7 (2102.4–2491.2)	
	Sin ECV	KDN	0.94 (0.43–1.69)	0.561
	ECV		1.4 (1.05–1.64)	
	Sin Diabetes	Neu5Ac _{libre}	421.4 (357–543.5)	0.07
	Diabetes		650.7 (471.7–741.9)	
Diabetes	Sin Diabetes	Neu5Ac _{conj}	33069.2 (26338.8–40208.3)	0.09
	Diabetes		36394.8 (34111.9–44443.5)	
	Sin Diabetes	Neu5Ac _{total}	33550.4 (26822.2–40615.6)	0.10
	Diabetes		36959.9 (34464.1–45163.2)	
	Sin Diabetes	ManNAc _{libre}	86.4 (73.6–102.8)	0.53
	Diabetes		90.7 (76.3–123.6)	
	Sin Diabetes	ManNAc _{conj}	1421.7 (1154.9–1944.8)	0.60
	Diabetes		1507.8 (1184.7–2172.3)	
Hipertensión	Sin Diabetes	ManNAc _{total}	1513.4 (1230.9–2073.6)	0.59
	Diabetes		1570.7 (1300–2309.6)	
	Sin Diabetes	KDN	0.9 (0.42–1.57)	0.016
	Diabetes		1.52 (1.12–2.67)	
	Sin Hipertensión	Neu5Ac _{libre}	426.2 (358.8–553.8)	0.77
	Hipertensión		446.7 (350.9–673.9)	
	Sin Hipertensión	Neu5Ac _{conj}	32359.6 (26302.4–39894.6)	0.01
	Hipertensión		37649.4 (35189.1–44834.2)	
Hipertensión	Sin Hipertensión	Neu5Ac _{total}	32882.5 (26626–40267.5)	0.01
	Hipertensión		38206.2 (35581.1–45194)	
	Sin Hipertensión	ManNAc _{libre}	85 (73.6–101.8)	0.22
	Hipertensión		97.8 (77.4–123.9)	

Sin Hipertensión	ManNAc _{conj}	1421.7 (1137.3–1914.7)	0.09
Hipertensión		1985.3 (1279–2696.6)	
Sin Hipertensión	ManNAc _{total}	1513.4 (1221.3–2019.2)	0.09
Hipertensión		2128.1 (1378.8–2808.8)	
Sin Hipertensión	KDN	0.96 (0.43–1.69)	0.793
Hipertensión		1.01 (0.68–1.43)	

ECV= Enfermedad cardiovascular.

Probabilidad de hipertensión según concentraciones séricas de Neu5Ac y ManNAc

Los modelos de regresión logística ajustados sugirieron una mayor probabilidad de hipertensión en función de las concentraciones de Neu5Ac conjugado y total ($p = 0,03$ y $p = 0,04$, respectivamente; Tabla 16).

Tabla 16. Regresión logística multivariable ajustada por tipo de dieta, IMC, edad, raza y sexo para las asociaciones entre Neu5Ac y ManNAc (suero) y ECV, diabetes e hipertensión

Compuesto	ECV OR (95% CI)	<i>p</i>	Diabetes OR (95% CI)	<i>p</i>	Hipertensión OR (95% CI)	<i>p</i>
Neu5AcLibre	0,999 (0,994–1,004)	0,61	1,000 (0,999–1,002)	0,6	1,000 (0,998–1,002)	0,74
Neu5AcConj	1,000 (1,000–1,000)	0,44	1,000 (1,000–1,000)	0,16	1,000 (1,000–1,000)	0,03
Neu5AcTotal	1,000 (1,000–1,000)	0,45	1,000 (1,000–1,000)	0,16	1,000 (1,000–1,000)	0,04
ManNAcLibre	1,010 (0,990–1,030)	0,32	1,012 (0,997–1,026)	0,11	1,012 (0,999–1,025)	0,08
ManNAcConj	1,001 (1,000–1,002)	0,16	1,000 (0,999–1,001)	0,8	1,001 (1,000–1,001)	0,09
ManNAcTotal	1,001 (1,000–1,001)	0,15	1,000 (0,999–1,001)	0,75	1,001 (1,000–1,001)	0,09
KDN	1,003 (0,979–1,027)	0,83	0,980 (0,947–1,015)	0,26	0,986 (0,963–1,010)	0,25

ECV: Enfermedad cardiovascular.

Asociación entre hipertensión según concentraciones séricas de Neu5Ac y ManNAc

Asimismo, los modelos de regresión lineal ajustados mostraron asociación entre hipertensión y mayores niveles de Neu5Ac (conjugado y total; $p = 0,047$ y $p = 0,051$) y de ManNAc libre ($p = 0,048$) (Tabla 17).

Tabla 17. Asociación de Diabetes, Hipertensión y ECV con Neu5Ac, ManNAc y KDN

Compuesto	Diabetes		Hipertensión		ECV	
	Coefficiente b (95% IC)	p	Coefficiente b (95% IC)	p	Coefficiente b (95% IC)	p
Neu5Aclibre	18,5 (-169, 142)	0,890	-95,8 (-314, 122)	0,387	-17,3 (-386, 351)	0,926
Neu5Aconj	4.127 (-2.822, 11.075)	0,242	5.752 (74,2, 11.430)	0,047	5.834 (-3.847, 15.515)	0,236
Neu5Actot	4.152 (2.814, 11.119)	0,241	5.665 (-30,9, 11.360)	0,051	5.817 (-3.891, 15.524)	0,238
ManNAclibre	19 (-3,27, 41,3)	0,09	18,5 (0,19, 36,90)	0,048	14,9 (-16,4, 46,2)	0,347
ManNAconj	13,3 (-510, 537)	0,960	363 (-68,9, 795)	0,098	596 (-132, 13.259)	0,108
ManNAactot	32,9 (-501, 567)	0,903	382 (-58,8, 822)	0,088	611 (-132, 1.354)	0,106
KDN	-11,5 (-39,2, 16,2)	0,414	0,684 (-0,045, 1,41)	0,065	0,143 (-1,10, 1,39)	0,820

ECV: Enfermedad cardiovascular. Los coeficientes beta obtenidos de la regresión lineal representan un cambio en la concentración de Neu5Ac, ManNAc y KDN de acuerdo con la variable predicha. Todas las variables predictoras se ajustaron por tipos de dieta, IMC, edad, raza y sexo.

6. DISCUSIÓN

6.1. Ácidos siálicos, dieta y adiposidad

En el presente estudio, comparamos ácidos siálicos presentes en tejido adiposo entre individuos que seguían patrones dietéticos habitualmente vegetarianos u omnívoros, encontrando niveles significativamente más altos de Neu5Ac en veganos y lacto-ovo-vegetarianos en comparación con los omnívoros.

En modelos murinos, la suplementación dietética con Neu5Ac redujo los efectos procoagulantes, protrombóticos y antifibrinolíticos de una dieta alta en grasas ^{379,466}. Así mismo, la administración exógena con Neu5Ac tiene un efecto protector intrínseco contra la aterosclerosis ³⁷⁹, además, una reducción de los eventos cardiovasculares relacionados con la coagulación en condiciones hiperlipidémicas ^{389,466} y la prevención de las manifestaciones clínicas de la enfermedad cardiovascular ^{379,466} se han registrado. Estos resultados experimentales podrían ser consistentes con las concentraciones más altas de Neu5Ac en tejido adiposo observadas en los participantes vegetarianos. Sin embargo, la eficacia de la suplementación dietaria con ácidos siálicos en humanos aún no ha sido confirmada.

También, los aumentos en los ácidos siálicos debidos a la ingesta dietética parecen estar asociados con mecanismos que contrarrestan la aterosclerosis, ya que los ácidos siálicos sirven como sustratos para la re-sialilación del endotelio vascular ^{374,375,467}. Por lo tanto, la presencia de ácidos siálicos en el endotelio vascular puede alterar estas superficies para reducir los riesgos de trombosis ³⁸⁹; pero los mecanismos de estos efectos siguen siendo en gran medida desconocidos. Del mismo modo, aún no se ha establecido un impacto positivo en la salud por ácidos siálicos relacionados con la dieta o por la suplementación de estos.

Por otro lado, la evidencia disponible sugiere una relación entre la sialilación y el metabolismo energético. En humanos, la obesidad y la presión arterial sistólica tienden a estar inversamente asociadas con la sialilación de IgG ³⁸², mientras que en modelos murinos la suplementación dietética con ManNAc previene la obesidad y la hipertensión ³⁸². En concordancia, nuestros resultados muestran que los niveles de KDN en tejido adiposo se asocian inversamente con el IMC, lo que refuerza la hipótesis de una modulación metabólica de la sialilación en la adiposidad.

Contrariamente, hay pruebas de que los ácidos siálicos totales en suero son un factor de riesgo de ECV y se correlacionan con la gravedad y la mortalidad de las ECV ⁴⁶⁸⁻⁴⁷⁰. Del mismo modo, se sabe que el aumento de los ácidos siálicos plasmáticos está asociado con la inflamación ^{471,472}. Dado que se sabe que el aumento de la función de la sialidasa está asociado con la inflamación ⁴⁷³, esto podría explicar mayor circulación de ácidos siálicos en estas circunstancias. Estudios también han informado que, en la obesidad, la sialilación de varias glicoproteínas metabólicamente beneficiosas se reduce, lo que parece inconsistente con los niveles elevados de ácido siálico total observados en el suero. Esta discrepancia podría explicarse por la eliminación o secreción de ácidos siálicos inducida por la inflamación, así como por el aumento de la producción de proteínas ricas en ácido siálico que responden a la inflamación, lo que podría enmascarar la disminución de la sialilación de glicoproteínas específicas ⁴⁷⁴.

Por lo tanto, dadas las funciones pleiotrópicas de los ácidos siálicos, no es inesperado que las concentraciones en suero o plasma no se correlacionen con las del tejido adiposo u otros tejidos ^{107,468,474,475}. En este contexto, parece que la absorción de ácidos siálicos por parte de ciertos tipos de células puede estar asociada con una respuesta inmunitaria amortiguada ^{386,476}. Por ende, si bien la relevancia fisiológica de una concentración más alta de ácidos siálicos adiposos en vegetarianos no está clara, esto puede reflejar una respuesta inmune o inflamatoria amortiguada, en relación con los omnívoros. Consecuentemente, los estudios futuros sobre el papel de la sialilación deberían abarcar no solo un análisis crudo de la concentración de ácidos siálicos en tejido adiposo o suero, sino también, por ejemplo, el análisis de proteínas glicoconjugadas.

6.2. Influencia de la dieta sobre los ácidos siálicos y presencia en tejido adiposo

Contexto fisiológico y relevancia del tejido adiposo

A diferencia del suero, se dispone de información limitada sobre los ácidos siálicos en los tejidos adiposos humanos. Además de su función como sitio primario para el almacenamiento excesivo de energía, el tejido adiposo también sirve como un órgano endocrino que sintetiza varios agentes biológicamente activos involucrados en la regulación de la homeostasis metabólica^{477,478}. Los constituyentes celulares del tejido adiposo incluyen adipocitos, células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y células precursoras del tejido adiposo^{477,479–481}. Sin embargo, la acumulación excesiva de tejido adiposo puede conducir a una secreción anormal de adipocitocinas u otras moléculas de señalización, lo que puede desencadenar procesos asociados con la diabetes, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (ECV)^{477–479,482,483}. La adiposidad es la base para el aumento del índice de masa corporal (IMC), que se sabe que es un factor de riesgo importante para las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, el cáncer y otras enfermedades^{484,485}. En la actualidad, las funciones de los ácidos siálicos no están claras en el contexto de la obesidad, la inflamación crónica y las ECV, lo que refuerza la necesidad de explorarlas en el tejido adiposo humano.

Hallazgos del presente estudio y comparación entre grupos dietarios

En el presente estudio, los niveles de Neu5Ac en tejido adiposo fueron significativamente más altos en participantes vegetarianos en comparación con omnívoros, mientras que el KDN mostró una tendencia similar, aunque sin alcanzar la significancia estadística, probablemente debido al tamaño muestral y poder estadístico limitados. Dado que ambos compuestos pueden unirse a estructuras de glicanos mediante distintos tipos de enlaces, (α 2,3-, α 2,4-, α 2,6- y α 2,8-), es plausible que KDN y Neu5Ac compartan un patrón biológico de comportamiento semejante³⁴. En este sentido, nuestros resultados sugieren que los patrones dietarios podrían modular de forma paralela las concentraciones de ambos ácidos siálicos en el tejido adiposo.

Los ácidos siálicos están presentes principalmente en productos de origen animal, por lo tanto, los mayores niveles de Neu5Ac y KDN en los vegetarianos no pueden atribuirse directamente a una ingesta, sino posiblemente a una síntesis endógena influenciada por la disponibilidad de precursores. En un estudio metabólico de la cohorte del AHS-2, se observaron diferencias significativas en los monosacáridos y metabolitos de las subclases de fructosa, manosa, galactosa

y pentosa entre veganos y omnívoros, lo que podrían afectar a los precursores implicados en la síntesis de ácidos siálicos ⁴⁸⁶. Esta vía sintética, aunque está bien caracterizada ⁴⁰, podría estar modulada por el perfil metabólico resultante de la dieta. Así, una dieta rica en carbohidratos complejos y baja en lípidos saturados podría favorecer el flujo metabólico hacia la síntesis *de novo* de Neu5Ac y KDN.

Influencia antiinflamatoria del patrón vegetariano

El patrón dietario vegetariano saludable se asocia con una menor inflamación sistémica, evidenciada por niveles más bajos de interleucina-6 y proteína C reactiva ⁴⁸⁷, así como con una reducción de compuestos proinflamatorios. Además, los vegetarianos también tienden a tener biomarcadores más bajos relacionados con el consumo de carne o lácteos, menos ácidos grasos saturados y lípidos que se sabe que están asociados a inflamación y riesgo cardiometabólico ⁴⁸⁶. Este entorno metabólico e inflamatorio más favorable podría promover una mayor estabilidad y preservación de los ácidos siálicos en el tejido adiposo. En contraposición, los niveles más bajos de Neu5Ac podrían reflejar un estado proinflamatorio basal o sostenido, asociado con la degradación de glicanos o con una menor actividad de las vías de sialilación.

Posible influencia indirecta del IMC y la adiposidad sobre los ácidos siálicos

Los resultados obtenidos muestran una relación inversa entre los niveles de KDN y el IMC (Tabla 8), aparentemente independiente de la dieta. Esta observación concuerda con reportes previos que describen concentraciones más bajas de ácidos siálicos en individuos obesos ³⁸². En la cohorte AHS-2, las personas que siguen dietas vegetarianas presentan menor riesgo de síndrome metabólico, incluido un IMC y una circunferencia de cintura más bajos ⁴⁵⁰, diabetes ⁴⁸⁸ o mortalidad por enfermedades cardiovasculares ⁴⁴¹. En este marco, una dieta basada en plantas podría inducir un entorno metabólico antiinflamatorio y un menor depósito de grasa, condiciones que favorecen un mayor contenido de ácidos siálicos en el tejido adiposo. A su vez, estos compuestos podrían contribuir a modular procesos inflamatorios locales, reforzando un ambiente metabólicamente favorable.

Los ácidos siálicos, a su vez, podrían ayudar a regular o prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas. Desde esta perspectiva, se podría esperar una mayor abundancia de Neu5Ac en el tejido adiposo de veganos y lacto-ovo-vegetarianos,

considerando los resultados cardiometabólicos favorables observados previamente en vegetarianos^{449,489,490}. Esto es coherente con el papel de Neu5Ac en la prevención de la aterosclerosis³⁷⁹. No obstante, se necesitan estudios epidemiológicos o clínicos más amplios para desentrañar específicamente las contribuciones de la dieta y el IMC a los niveles de ácidos siálicos y estos sobre las enfermedades crónicas.

Rol fisiopatológico de los ácidos siálicos en el tejido adiposo

A pesar de su potencial relevancia para la salud, los ácidos siálicos en el tejido adiposo han sido poco explorados en contraste con los ácidos siálicos en el plasma o las células cancerosas^{108,140,421,491}. Se ha descrito que la desialilación asociada a procesos patológicos puede inducir disfunción celular⁴⁷³. En el contexto cardiovascular, las sialidasas pueden inducir la escisión de Neu5Ac a partir de las cadenas de glicanos de la glicoproteína LDL y los glicolípidos durante la fase inicial de la aterosclerosis³¹. Después de esto, durante la progresión de la ECV, mientras se produce la desialilación en los glicoconjugados, los ácidos siálicos totales séricos pueden aumentar^{27,377}. En consecuencia, podría hipotetizarse que, durante procesos inflamatorios o ateroscleróticos, los ácidos siálicos sean liberados desde el tejido adiposo u otros compartimentos tisulares como una respuesta compensatoria para atenuar el daño endotelial o reducir la inflamación sistémica. En este contexto, los niveles tisulares más altos observados en vegetarianos podrían reflejar una menor necesidad de liberación sistémica de ácidos siálicos o, alternativamente, un estado inflamatorio basal más bajo, coherente con los perfiles metabólicos saludables de este grupo⁴⁹².

6.3. Consideraciones metodológicas y limitaciones del estudio

Desafíos técnicos en la cuantificación de monosacáridos

Existen desafíos de cuantificación de monosacáridos como la ManNAc, el KDN y el Neu5Ac a través de métodos HPLC-MS/MS, debido a: (a) bajo peso molecular, (b) la carga y (c) la presencia de múltiples grupos hidroxilo. En teoría, ManNAc, KDN y Neu5Ac se pueden resolver fácilmente con cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC), utilizando una combinación de disolvente orgánico y tampón acuoso como fases móviles⁴⁹³⁻⁴⁹⁵. La fase móvil orgánica altamente volátil provoca una baja contrapresión debido a su viscosidad reducida⁴⁹⁶. Además, el solvente orgánico, como el acetonitrilo, promueve la formación de gotas más pequeñas debido a la menor tensión superficial, lo que mejora la eficiencia de la desolvatación^{497,498}, lo que

genera más iones dentro de la fuente de electropulverización ⁴⁹⁹ y por ende, más iones detectados por el espectrómetro de masas ⁵⁰⁰⁻⁵⁰², mejorando la sensibilidad.

Sin embargo, la retención cromatográfica de estos dos compuestos de la misma matriz de muestra con una sola columna de HPLC ha sido un desafío técnico importante en algunos estudios ⁴⁶⁴, particularmente, la escasa consistencia en los tiempos de retención en una columna HILIC ^{495,503,504}. Algunos análisis de ManNAc y Neu5Ac se han informado previamente; pero estos realizan la separación de los compuestos con ayuda de dos columnas cromatográficas por separado, lo cual implica mayores gastos de materiales, mayor consumo de tiempo y la complejidad operativa ^{463,464}.

Optimización del método analítico empleado

El uso de patrones internos marcados con isótopos estables para ManNAc o Neu5Ac, *N*-acetil-D-[UL-¹³C₆]manosamina o ácido *N*-acetil-D-[1,2,3-¹³C₃]neuramínico, respectivamente, es una estrategia analítica muy valiosa ^{505,506}. Este enfoque se basa en las propiedades fisicoquímicas equivalentes de los patrones marcados con isótopos y los biomarcadores probados. En consecuencia, los estándares marcados se comportaron de manera consistente con los biomarcadores probados durante la extracción, la separación instrumental y la detección específica ^{456,506}. Además, el uso de isótopos proporciona un control de calidad interno, facilitando la corrección de variables de medición no contabilizadas ^{507,508} y ayudando a minimizar los efectos de supresión/mejora de iones durante el análisis LC-MS/MS ⁴⁵⁷. La adición de estándares marcados con isótopos antes de la extracción de la muestra permite una estimación fiable de la concentración de moléculas dentro de una muestra. El método aquí propuesto incluyó el uso de isótopos como controles durante todos los procedimientos de extracción y medición de los monosacáridos.

Optimización del método cromatográfico

Se ha desarrollado la separación de KDN, Neu5Ac y ManNAc mediante un solo procedimiento cromatográfico, con una misma columna HILIC y con buena repetibilidad del tiempo de retención y con uso de controles internos. De manera que el método aquí expuesto podría considerarse como valioso por ser sensible y específico para separar y detectar ManNAc, KDN y Neu5Ac no derivados en muestras biológicas utilizando un solo tipo de columna de HPLC con una fase hidrófila estacionaria.

Rendimiento y métodos previos

El método presentado cumple con los requisitos de alto rendimiento para estos azúcares. La técnica tiene la exactitud, precisión y sensibilidad deseadas (Tablas 6 y 7) dentro de amplios rangos de concentración. Además, el proceso de preparación de muestras es relativamente sencillo. El volumen de muestra requerido es inferior a 50 μL , el volumen de inyección es de 5 μL y el tiempo total de funcionamiento del instrumento es de 6 min, incluido el reacondicionamiento de la columna después de cada inyección de muestra. Los métodos publicados anteriormente utilizaban volúmenes de muestra más grandes y/o tiempos de ejecución más largos ^{27,367,377,403,464,473,509,510}.

Los métodos empleados se consideran adecuados debido a (1) los bajos límites de detección y cuantificación para ManNAc y Neu5Ac, y (2) un proceso relativamente sencillo. En consecuencia, la metodología descrita puede implementarse de forma rutinaria con fines de diagnóstico o seguimiento para individuos con condiciones asociadas con ManNAc o Neu5Ac alterados en laboratorios que cuenten ya sea con el equipo LC-MS/MS o tengan la opción de derivación de muestras para su estudio en centros de análisis de espectrometría de masas.

Fortalezas metodológicas del estudio

Ahora, ManNAc y Neu5Ac se miden utilizando un método directo y relativamente sencillo, sin pasos de derivatización, utilizando una columna HILIC, lo que garantiza una buena repetibilidad del tiempo de retención, buenas formas de pico cromatográfico, excelente selectividad y alta sensibilidad en ESI-MS.

Las fortalezas de este estudio incluyen el número de vegetarianos y omnívoros habituales en la cohorte del Estudio Adventista de Salud 2 y los registros detallados de la dieta y el historial de salud de estos participantes. Además, el uso de normas internas y otros procedimientos de control de calidad ayudó a garantizar una medición precisa y coherente de ácidos siálicos en muestras de suero y tejido adiposo humano. Además, los ácidos siálicos se midieron cuantitativamente utilizando un método directo y relativamente sencillo, sin pasos de derivatización. Algunos métodos analíticos para ManNAc o Neu5Ac y su cuantificación implican pasos de derivatización previos a la cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) ^{4,511,512}. Sin embargo, estos pasos de derivatización alargan la preparación de la muestra y aumentan la complejidad del ensayo ^{513,514}.

Limitaciones

La principal limitación de este estudio es el modesto tamaño de la muestra. Esto probablemente redujo la significación estadística de la asociación entre la KDN y el patrón dietético y el papel contribuyente de la adiposidad. Los niveles de ácido siálico libres y conjugados en el tejido adiposo humano no están claros en el estudio actual, ya que no se midieron por separado y, en consecuencia, no se pudieron comparar. Todas las mediciones de ácidos siálicos se realizaron utilizando muestras de biopsia de un solo punto de tiempo, que pueden ocultar variaciones estacionales u otras variaciones temporales. Además, aunque se espera que las muestras de tejido adiposo incluyan en gran medida células adiposas, es probable que otros tipos de células, incluidas algunas células endoteliales vasculares y fibroblastos, estén representados hasta cierto punto. Por lo tanto, no se pudo determinar completamente la fuente de ácidos siálicos. Debido a las limitaciones del tamaño de la muestra, el análisis de las asociaciones de las concentraciones de ácidos siálicos con diversos parámetros fisiológicos de interés se ha limitado al IMC.

6.4. Implicaciones clínicas y perspectivas futuras

Contexto general de los monosacáridos y relevancia clínica

Varias enfermedades están asociadas con concentraciones inusuales de monosacáridos, debido a la alteración de la síntesis o degradación de estos ⁵¹⁵. Se han informado estudios de tales monosacáridos, por ejemplo, en cánceres ⁵¹⁶, enfermedades cardiovasculares (561), miopatía GNE ⁵¹⁷, enfermedades neurodegenerativas ^{518,519}, diabetes tipo 2 ⁵²⁰ y otros trastornos. En este contexto, resulta relevante explorar cómo las variaciones en ManNAc y Neu5Ac podrían relacionarse con factores fisiológicos y clínicos en humanos.

Ácidos siálicos y diferencias demográficas observadas en el estudio

En el presente estudio, se identificaron asociaciones entre las concentraciones de ácidos siálicos y diversas características demográficas y fisiológicas: sexo, raza, IMC, enfermedad cardiovascular y edad.

La concentración de Neu5Ac total y conjugado en suero es mayor en mujeres (edad promedio = 60,0) en comparación con hombres (edad promedio = 59,6), 36,01 ng/mL vs 32,36 ng/mL ($p = 0,026$) y 35,44 ng/mL vs 31,88 ng/mL ($p = 0,029$). Esto es consistente con otros informes de un

aumento significativo dependiente de la edad en el ácido siálico sérico en mujeres posmenopáusicas y una disminución notable en los hombres ⁵²¹.

En cuanto a las diferencias étnicas, la ManNAc total y conjugada son más altos en sujetos negros en comparación con los blancos, 1,901 y 1,408 ng/mL ($p < 0,001$); 1,808 y 1,318 ng/mL, respectivamente ($p < 0,001$). Los mecanismos biológicos dependientes de la raza pueden contribuir a una mayor expresión de ManNAc total y conjugado. Los resultados presentados concuerdan con los estudios sobre las diferencias étnicas en el *N*-glicoma sérico humano sano, informando la mayor abundancia de la mayoría de las glicoformas en los etíopes ⁵²². Además, los carbohidratos, como la fructosa, la manosa y la galactosa, se podrían metabolizar de manera diferente en las poblaciones negras en comparación con las blancas ⁵²³.

Así mismo, los sujetos con un IMC más alto tienden a tener niveles más altos de ManNAc libre ($p = 0,040$). Los estudios *in vivo* demuestran que la suplementación dietética con ManNAc, como el primer precursor de Neu5Ac ^{524,525}, previene la obesidad y la hipertensión sistólica en ratones. Esto también “rompería” la asociación entre obesidad e hipertensión ³⁸². Sin embargo, hasta ahora no hay evidencia de estudios en humanos que establezcan una correlación entre la obesidad/IMC y los niveles de ManNAc.

De manera consistente con lo anterior, aquellos participantes de la población estudiada con ECV o hipertensión y con mayor IMC (Tabla 12) tienen niveles más altos de Neu5Ac (Neu5Ac conjugado: 37.649,4 vs 32.359,6 ng/mL, $p = 0,01$; Neu5Ac total: 38.206,2 vs 32.882,5 ng/mL, $p = 0,01$) o ManNAc (ManNAc libre: 105,3 vs 85,0 ng/mL, $p = 0,05$; ManNAc conjugado: 2.183,2 vs 1.418,9 ng/mL, $p = 0,04$; ManNAc total: 2294,7 vs 1511,7 ng/mL, $p = 0,04$) en comparación con participantes sanos, coincidiendo así con la literatura ^{376,526}. Tal como se ha señalado, estos monosacáridos podrían ser la consecuencia del estado inflamatorio en proceso, antes que la causa de la inflamación en sí, y su nivel aumentando se explicaría como un mecanismo del cuerpo en donde la secreción de estas sustancias cumpliría la función de controlar la respuesta inflamatoria ^{357,376}. De hecho, se ha demostrado la acción antiinflamatoria de la suplementación de estos azúcares ^{379,382,527}.

Por último, en relación con la edad, los sujetos mayores tienen niveles más altos de ManNAc libre ($p < 0,001$) o total ($p = 0,045$). Mientras que el proceso de envejecimiento se asocia con disfunción cognitiva ⁵²⁸, no está claro qué papel desempeña ManNAc, más allá de ser el precursor base del Neu5Ac. Curiosamente, un estudio *in vivo* informó que el tratamiento con ManNAc puede tener beneficios terapéuticos potenciales con respecto a la disfunción cognitiva ⁵²⁹. En humanos, durante el proceso de envejecimiento, el aumento de ManNAc podría activarse para la síntesis compensatoria de Neu5Ac y las cadenas de ácido polisiálico. Estos carbohidratos son constituyentes críticos de los gangliósidos cerebrales, que modulan las moléculas de adhesión de las células neuronales. Sin embargo, la asociación de ManNAc y Neu5Ac con las funciones cerebrales en estudios epidemiológicos aún no se ha explorado más a fondo.

El proceso de envejecimiento implica también una remodelación del sistema inmunológico. Dicha remodelación se asocia con inflamación crónica de bajo grado (inflammaging) ^{530,531}. Ejemplos de tales procesos regulados incluyen el control y mantenimiento de los cromosomas, los procesos transcripcionales, el transporte nuclear, la estructura citoesquelética, la autofagia, la señalización y la matriz extracelular ^{532,533}. Es posible que, durante el proceso de envejecimiento, se produzca un aumento de la síntesis de ManNAc para facilitar la síntesis de Neu5Ac y su incorporación a los glicoconjugados de la membrana celular. Esto puede verse como una respuesta fisiológica compensatoria para mitigar o contrarrestar la inflamación, como previamente se ha señalado ³⁵⁷. Curiosamente, la expresión de α -2,6-sialitiltransferasa I (*ST6Gal I*), que transfiere ácido siálico a residuos de galactosa de *N*-glicanos, disminuye en células envejecidas ⁵³⁴. Esto explica un Neu5Ac más bajo, a pesar del aumento de la síntesis celular de ManNAc.

Mecanismos biológicos propuestos

Estas diferencias observadas podrían explicarse a través de mecanismos bioquímicos asociados a la síntesis, transporte y función de los ácidos siálicos.

Si bien el papel de ManNAc en las superficies celulares eucariotas no está bien descrito, se sabe que ManNAc es absorbido y metabolizado por las células ⁵³⁵. Una vez en la célula, ManNAc puede ser utilizado para la producción de ácido neuramínico, un precursor del monosacárido carboxilado de 9 carbonos, ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) (Figura 1), que es la principal forma humana más abundante de ácido siálico ^{21,517}. Comúnmente, Neu5Ac es un residuo de azúcar conjugado

en los extremos de las estructuras de oligosacáridos en glicoproteínas y glicolípidos ^{8,107}, y con menos frecuencia en forma libre ^{107,109,462,522,536}. La abundancia de Neu5Ac parece ser específica del sitio y dependiente del contexto celular y tisular ^{367,459,522,537,538}. Su síntesis se controla mediante la regulación enzimática y la ingesta dietética ^{357,536}.

En este mismo sentido, hasta la fecha, no se tienen datos sobre la forma conjugada de ManNAc en sueros humanos, y las vías detalladas que incorporan todos los intermediarios en la síntesis de azúcares de 9 carbonos siguen sin estar claras ¹⁵⁹. Al ser el ManNAc una molécula neutra, su paso a través de las membranas podría ocurrir por difusión simple o facilitada. De hecho, los estudios *in vitro* indican que ManNAc ingresa al espacio intracelular por difusión pasiva o a través de un transportador de membrana desconocido ^{89,91}. Adicionalmente, se han informado niveles significativos de GlcNAc y ManNAc entre los productos de fermentación, lo cual implicaría que estos carbohidratos pueden ser exportados por transportadores aún no identificados bajo ciertas condiciones ^{62,159}.

Una posible explicación integradora podría involucrar a los ácidos siálicos como mitigadores de los procesos inflamatorios, pero esto aún no se ha confirmado. Se esperaría que la activación de diferentes respuestas antiinflamatorias compensatorias o antiinflamatorias se activen para prevenir el daño tisular excesivo ⁵³⁹.

Además, los hábitos de vida saludables podrían modular estas respuestas compensatorias y los niveles de ácidos siálicos circulantes. Se ha demostrado que adoptar un estilo de vida saludable, incluso en la vejez, podría prolongar la longevidad de las personas, incluso para aquellos con un alto riesgo genético de una vida más corta ^{540,541}. En consecuencia, las concentraciones más altas de ManNAc y Neu5Ac, en lugar de ser el producto de enfermedades específicas, en algunos contextos, podrían representar los esfuerzos celulares de compensar los procesos inflamatorios que ocurren en una variedad de afecciones con diferentes etiologías.

Fortalezas y limitaciones metodológicas del análisis clínico

Las fortalezas, en esta parte del estudio, incluyen el uso de muestras de una población epidemiológica bien caracterizada. Además, el uso de pequeños volúmenes de muestras de suero humano, la incorporación de estándares internos y los procedimientos de control de calidad

optimizaron el uso de muestras y garantizaron una medición precisa y consistente de ManNAc y Neu5Ac. Además, estos monosacáridos se midieron cuantitativamente utilizando un método directo y relativamente sencillo, sin pasos de derivatización, con separación de analitos en la misma columna. Aunque se ha demostrado que la raza y el IMC son factores clave que determinan la concentración de ManNAc y Neu5Ac, la actividad física y una variedad de otras variables podrían ayudar a proporcionar una mejor comprensión, entre otros aspectos.

Sin embargo, también deben reconocerse algunas limitaciones que restringen la generalización de los resultados. Una de las limitaciones de este estudio es que no se utilizaron otras columnas para comparar el rendimiento con la columna HILIC para la separación de ManNAc y Neu5Ac. Además, la validez externa limitada en este estudio está implícita, dado el modesto tamaño de la muestra y la población. También, una mayor exploración de los efectos étnicos, más allá de la distinción entre blanco y negro, podría proporcionar nuevas ideas.

Perspectivas futuras y líneas de investigación

Finalmente, las observaciones anteriores abren nuevas oportunidades para la investigación en el campo de los glicanos y la biología de los ácidos siálicos. Varios factores pueden influir en los niveles humanos de ManNAc y Neu5Ac y sus funciones, incluidos la genética^{525,538}, la dieta^{65,357,379} y la edad^{115,522,526,536}. En este contexto, la relación entre los niveles de formas particulares de ácidos siálicos y el estilo de vida o las características demográficas sigue sin estar clara. Por ejemplo, no está claro cómo la dieta humana afecta las concentraciones de Neu5Ac en varios tejidos u órganos. El Neu5Ac se encuentra en alimentos como carnes rojas, leche materna, leche bovina, huevos e incluso en tipos inusuales de alimentos como nidos de pájaros comestibles^{46,84,542}; aún se desconoce el impacto de estos alimentos en los niveles de Neu5Ac. Por lo tanto, parece razonable plantear la hipótesis de que su concentración puede ser alterada por componentes de la dieta, aunque esto aún no se ha investigado en un estudio de cohorte.

Asimismo, los niveles de sialilación varían a lo largo del desarrollo, el crecimiento y el envejecimiento^{543,544}. Por ejemplo, se observa una sialilación alterada en la senescencia celular⁵⁴⁴. De acuerdo con esto, los modelos de envejecimiento in vitro muestran una disminución de la expresión génica de la α -2,6-sialil transferasa I, que transfiere ácido siálico a los residuos de galactosa de N-glicanos⁵³⁴. Tales cambios asociados con la edad en las modificaciones terminales

de los glicanos reflejan cambios fisiológicos a nivel celular, tisular y sistémico ⁵⁴⁴. Además, la expresión aberrante de Neu5Ac en glicoconjugados es característica en algunos estados patológicos, incluidos los cánceres. Esto plantea la posibilidad de que ciertos ácidos siálicos se conviertan en biomarcadores prometedores ^{393,429,522,545,546}.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se presentó un método HPLC-MS/MS relativamente sencillo para la extracción, detección y cuantificación simultáneas de ManNAc, KDN y Neu5Ac en muestras humanas, particularmente, tejido adiposo y suero. Este procedimiento representa una herramienta útil para futuras investigaciones sobre la función de los ácidos siálicos y sus precursores en diferentes matrices biológicas.

El método propuesto mostró precisión, sensibilidad y reproducibilidad adecuadas para la cuantificación de ManNAc, KDN y Neu5Ac en ambas matrices. Además, el método permitió detectar y cuantificar KDN en suero, un logro relevante dada la dificultad habitual para determinar este compuesto en fluidos biológicos. La validación del método sugiere que puede facilitar estudios sobre el rol de estos monosacáridos en diversas enfermedades, enfoques terapéuticos y medicina personalizada.

En el tejido adiposo, al detectar y cuantificar el Neu5Ac y KDN en individuos con dietas vegetarianas y no vegetarianas habituales, se encontró que el Neu5Ac está en concentraciones significativamente más altas en el tejido de veganos y lacto-ovo-vegetarianos en comparación con los omnívoros. Por otro lado, los niveles de KDN mostraron una asociación inversa modesta pero significativa con el IMC. Estos resultados sugieren que los patrones dietéticos podrían modular los niveles de ácidos siálicos a través de mecanismos vinculados con la acumulación de tejido adiposo o la regulación de la inflamación, lo cual puede impactar en la aparición o progresión de enfermedades crónicas.

En suero, se observaron diferencias notables en estos monosacáridos según edad, IMC, sexo y raza. El ManNAc libre se asoció positivamente con IMC y edad, mientras que el ManNAc conjugado y total resultó mayor en sujetos negros que en blancos. El Neu5Ac conjugado y total fue significativamente mayor en mujeres que en hombres. Aunque no se hallaron diferencias significativas en las concentraciones de KDN entre grupos raciales ni entre tipos dietarios al ajustar por covariables, el método permitió su cuantificación confiable en suero.

En el suero, las concentraciones de Neu5Ac (conjugado y total) y ManNAc (libre) tendieron a ser más elevadas en participantes con hipertensión, lo que sugiere un posible papel de estos

azúcares en la fisiopatología cardiovascular. Sin embargo, debido al reducido número de casos, estos hallazgos deben considerarse exploratorios.

El método desarrollado para la determinación de ácidos siálicos y precursor constituye una herramienta analítica confiable y versátil que puede aplicarse en futuros estudios en diversas muestras humanas, permitiendo su cuantificación. Combinado con enfoques multiómicos, este tipo de análisis podría contribuir a comprender mejor el papel de estos monosacáridos en la salud humana y en la progresión de enfermedades crónicas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tarbell JM, Cancel LM. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J Intern Med.* 2016;280(1):97-113. doi:10.1111/joim.12465
2. Lucas TM, Gupta C, Altman MO, et al. Mucin-mimetic glycan arrays integrating machine learning for analyzing receptor pattern recognition by influenza A viruses. *Chem.* 2021;7(12):3393-3411. doi:10.1016/j.chempr.2021.09.015
3. Ebong EE, Macaluso FP, Spray DC, Tarbell JM. Imaging the Endothelial Glycocalyx In Vitro by Rapid Freezing/Freeze Substitution Transmission Electron Microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(8):1908-1915. doi:10.1161/ATVBAHA.111.225268
4. Du J, Zhang Q, Li J, Zheng Q. LC-MS in combination with DMBA derivatization for sialic acid speciation and distribution analysis in fish tissues. *Anal Methods.* 2020;12(17):2221-2227. doi:10.1039/D0AY00100G
5. Möckl L, Pedram K, Roy AR, et al. Quantitative Super-Resolution Microscopy of the Mammalian Glycocalyx. *Dev Cell.* 2019;50(1):57-72.e6. doi:10.1016/j.devcel.2019.04.035
6. Malykh YN, Schauer R, Shaw L. N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie.* 2001;83(7):623-634. doi:10.1016/S0300-9084(01)01303-7
7. Kooner AS, Yu H, Chen X. Synthesis of N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) and its glycosides. *Front Immunol.* 2019;10:1-24. doi:10.3389/fimmu.2019.02004
8. Amanda L. Lewis, Xi Chen, Ronald L. Schnaar, and Ajit Varki. Sialic acids and other Nonulosonic Acids. In: *Essential of Glycobiology*. 4Th ed. Cold Spring Harbor (NY); 2022:316-344.
9. Chen X, Varki A. Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS Chem Biol.* 2010;5(2):163-176. doi:10.1021/cb900266r
10. Traving C, Schauer R. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54(12):1330-1349. doi:10.1007/s000180050258
11. Inoue S, Lin SL, Chang T, et al. Identification of free deaminated sialic acid (2-keto-3-deoxy-D-glycero- D-galacto-nononic acid) in human red blood cells and its elevated expression in fetal cord red blood cells and ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 1998;273(42):27199-27204. doi:10.1074/jbc.273.42.27199
12. Inoue S, Kitajima K, Sato C, Go S. Human KDN (Deaminated Neuraminic Acid) and Its Elevated Expression in Cancer Cells: Mechanism and Significance. In: Wu AM, ed. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-3*. Vol 705. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US; 2011:669-678. doi:10.1007/978-1-4419-7877-6_35

13. Schauer R. Sialic acids: Fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology*. 2004;107(1):49-64. doi:10.1016/j.zool.2003.10.002
14. Persat F, Bouhours JF, Petavy AF, Mojon M. Gangliosides of *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 1994;1225(3):297-303. doi:10.1016/0925-4439(94)90010-8
15. Yeşilyurt B, Şahar U, Deveci R. Determination of the type and quantity of sialic acid in the egg jelly coat of the sea urchin *Paracentrotus lividus* using capillary LC-ESI-MS/MS. *Mol Reprod Dev*. 2015;82(2):115-122. doi:10.1002/mrd.22448
16. Saito M, Kitamura H, Sugiyama K. Occurrence of gangliosides in the common squid and pacific octopus among protostomia. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2001;1511(2):271-280. doi:10.1016/S0005-2736(01)00282-6
17. Elayabharathi T, Vinoliya Josephine Mary J, Mary Mettilda Bai S. Characterization of a novel O-acetyl sialic acid specific lectin from the hemolymph of the marine crab, *Atergatis integerrimus* (Lamarck, 1818). *Fish Shellfish Immunol*. 2020;106:1131-1138. doi:10.1016/j.fsi.2020.07.039
18. Guerardel Y, Chang LY, Fujita A, et al. Sialome analysis of the cephalochordate *Branchiostoma belcheri*, a key organism for vertebrate evolution. *Glycobiology*. 2012;22(4):479-491. doi:10.1093/glycob/cwr155
19. Varki A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*. 2007;446(7139):1023-1029. doi:10.1038/nature05816
20. Eneva R, Engibarov S, Abrashev R, Krumova E, Angelova M. Sialic acids, sialoconjugates and enzymes of their metabolism in fungi. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2021;35(1):346-357. doi:10.1080/13102818.2021.1879678
21. Ghosh S. Sialic acid and biology of life: An introduction. In: *Sialic Acids and Sialoglycoconjugates in the Biology of Life, Health and Disease*. Academic Press; 2020:1-61. doi:10.1016/B978-0-12-816126-5.00001-9
22. Campetella O, Buscaglia CA, Mucci J, Leguizamón MS. Parasite-host glycan interactions during *Trypanosoma cruzi* infection: trans-Sialidase rides the show. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2020;1866(5):165692. doi:10.1016/j.bbadis.2020.165692
23. Iijima R, Takahashi H, Namme R, Ikegami S, Yamazaki M. Novel biological function of sialic acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger. *FEBS Lett*. 2004;561(1-3):163-166. doi:10.1016/S0014-5793(04)00164-4
24. Ghosh S. Sialic acid and biology of life: An introduction. In: *Sialic Acids and Sialoglycoconjugates in the Biology of Life, Health and Disease*. Elsevier; 2020:1-61. doi:10.1016/B978-0-12-816126-5.00001-9

25. Yang H, Lu L, Chen X. An overview and future prospects of sialic acids. *Biotechnol Adv.* 2021;46(July 2020):107678. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107678
26. Schauer R. Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J.* 2014;17:485-499. doi:10.1023/A
27. Gopaul KP, Crook MA. Sialic acid: A novel marker of cardiovascular disease? *Clin Biochem.* 2006;39(7):667-681. doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.02.010
28. Schauer R. Achievements and Challenges of Sialic Acid Research. *Glycoconj J.* 2000;17:485-499. doi:10.1023/A:1011062223612
29. Paul A, Padler-Karavani V. Evolution of sialic acids: Implications in xenotransplant biology. *Xenotransplantation.* 2018;(May):e12424. doi:10.1111/xen.12424
30. Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: An evolutionary perspective. *Chem Rev.* 2002;102(2):439-469. doi:10.1021/cr000407m
31. Zhang C, Chen J, Liu Y, Xu D. Sialic acid metabolism as a potential therapeutic target of atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 2019;18(1):173. doi:10.1186/s12944-019-1113-5
32. Soulillou JP, Süsal C, Döhler B, Opelz G. No increase in colon cancer risk following induction with neu5Gc-bearing rabbit anti-T cell igg (ATG) in recipients of kidney transplants. *Cancers.* 2018;10(9):11-13. doi:10.3390/cancers10090324
33. Inoue S, Kitajima K, Inoue Y. Identification of 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactonononic acid (KDN, deaminoneuraminic acid) residues in mammalian tissues and human lung carcinoma cells. Chemical evidence of the occurrence of KDN glycoconjugates in mammals. *J Biol Chem.* 1996;271(40):24341-24344. doi:10.1074/jbc.271.40.24341
34. Inoue S, Kitajima K. KDN (Deaminated neuraminic acid): Dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family. *Glycoconj J.* 2006;23(5-6):277-290. doi:10.1007/s10719-006-6484-y
35. Wang F, Xie B, Wang B, Troy FA. LC-MS/MS glycomic analyses of free and conjugated forms of the sialic acids, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in human throat cancers. *Glycobiology.* 2015;25(12):1362-1374. doi:10.1093/glycob/cwv051
36. Chen Y, Pan L, Liu N, Troy FA, Wang B. LC-MS/MS quantification of N-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid and ketodeoxynonulosonic acid levels in the urine and potential relationship with dietary sialic acid intake and disease in 3-to 5-year-old children. *Br J Nutr.* 2014;111(2):332-341. doi:10.1017/S0007114513002468
37. Lewis AL, Toukach P, Bolton E, et al. Cataloging natural sialic acids and other nonulosonic acids (NulOs), and their representation using the Symbol Nomenclature for Glycans. *Glycobiology.* 2023;33(2):99-103. doi:10.1093/glycob/cwac072

38. K. Guin S, Velasco-Torrijos T, Dempsey E. Explorations in a galaxy of sialic acids: a review of sensing horizons, motivated by emerging biomedical and nutritional relevance. *Sens Diagn.* 2022;1(1):10-70. doi:10.1039/D1SD00023C
39. Vos GM, Hooijschuur KC, Li Z, et al. Sialic acid O-acetylation patterns and glycosidic linkage type determination by ion mobility-mass spectrometry. *Nat Commun.* 2023;14(1):6795. doi:10.1038/s41467-023-42575-x
40. Chou WK, Hinderlich S, Reutter W, Tanner ME. Sialic Acid Biosynthesis: Stereochemistry and Mechanism of the Reaction Catalyzed by the Mammalian UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase. *J Am Chem Soc.* 2003;125(9):2455-2461. doi:10.1021/ja021309g
41. Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 2008;14(8):351-360. doi:10.1016/j.molmed.2008.06.002
42. Pawluczyk IZA, Najafabadi MG, Brown JR, Bevington A, Topham PS. Sialic acid supplementation ameliorates puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2015;95(9):1019-1028. doi:10.1038/labinvest.2015.78
43. van Karnebeek CDM, Bonafé L, Wen XY, et al. NANS-mediated synthesis of sialic acid is required for brain and skeletal development. *Nat Genet.* 2016;48(7):777-784. doi:10.1038/ng.3578
44. Möckl L. The Emerging Role of the Mammalian Glycocalyx in Functional Membrane Organization and Immune System Regulation. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8. <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2020.00253>
45. Wang B. Molecular mechanism underlying sialic acid as an essential nutrient for brain development and cognition. *Adv Nutr.* 2012;3(3):465-472. doi:10.3945/an.112.001875
46. Bian D, Wang X, Huang J, Chen X, Li H. Maternal Neu5Ac Supplementation During Pregnancy Improves Offspring Learning and Memory Ability in Rats. *Front Nutr.* 2021;8:641027. doi:10.3389/fnut.2021.641027
47. Cho A, Christine M, Malicdan V, et al. Sialic acid deficiency is associated with oxidative stress leading to muscle atrophy and weakness in GNE myopathy. *Hum Mol Genet.* 2017;26(16):3081-3093. doi:10.1093/hmg/ddx192
48. Pogoryelova O, González Coraspe JA, Nikolenko N, Lochmüller H, Roos A. GNE myopathy: from clinics and genetics to pathology and research strategies. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):70. doi:10.1186/s13023-018-0802-x
49. den Hollander B, Rasing A, Post MA, et al. NANS-CDG: Delineation of the Genetic, Biochemical, and Clinical Spectrum. *Front Neurol.* 2021;12:668640. doi:10.3389/fneur.2021.668640

50. Betenbaugh MJ, Yin B, Blake E, Kristoffersen L, Narang S, Viswanathan K. N-Acetylneuraminic Acid Synthase (NANS). In: Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata T, eds. *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*. Springer Japan; 2014:1523-1536. doi:10.1007/978-4-431-54240-7_11
51. Jin J, Fang F, Gao W, et al. The Structure and Function of the Glycocalyx and Its Connection With Blood-Brain Barrier. *Front Cell Neurosci*. 2021;15. <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2021.739699>
52. Houghton AN, Guevara-Patiño JA. Immune recognition of self in immunity against cancer. *J Clin Invest*. 2004;114(4):468-471. doi:10.1172/JCI22685
53. Li F, Ding J. Sialylation is involved in cell fate decision during development, reprogramming and cancer progression. *Protein Cell*. 2019;10(8):550-565. doi:10.1007/s13238-018-0597-5
54. Ghasempour S, Freeman SA. The glycocalyx and immune evasion in cancer. *FEBS J*. 2023;290(1):55-65. doi:10.1111/febs.16236
55. Wang M, Zhu J, Lubman DM, Gao C. Aberrant glycosylation and cancer biomarker discovery: a promising and thorny journey. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 2019;57(4):407-416. doi:10.1515/cclm-2018-0379
56. Hugonnet M, Singh P, Haas Q, von Gunten S. The Distinct Roles of Sialyltransferases in Cancer Biology and Onco-Immunology. *Front Immunol*. 2021;12. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.799861>
57. Le T, Ferling I, Qiu L, et al. Redistribution of the glycocalyx exposes phagocytic determinants on apoptotic cells. *Dev Cell*. 2024;59(7):853-868.e7. doi:10.1016/j.devcel.2024.01.020
58. Cho S, Zhu Z, Li T, et al. Human milk 3'-Sialyllactose is positively associated with language development during infancy. *Am J Clin Nutr*. 2021;114(2):588-597. doi:10.1093/ajcn/nqab103
59. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic Acids in the Brain: Gangliosides and Polysialic Acid in Nervous System Development, Stability, Disease, and Regeneration. *Physiol Rev*. 2014;94(2):461-518. doi:10.1152/physrev.00033.2013
60. Liu F, Simpson AB, D'Costa E, Bunn FS, van Leeuwen SS. Sialic acid, the secret gift for the brain. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2023;63(29):9875-9894. doi:10.1080/10408398.2022.2072270
61. Röhrig CH, Choi SSH, Baldwin N. The nutritional role of free sialic acid, a human milk monosaccharide, and its application as a functional food ingredient. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57(5):1017-1038. doi:10.1080/10408398.2015.1040113

62. Pang WW, Tan PT, Cai S, et al. Nutrients or nursing? Understanding how breast milk feeding affects child cognition. *Eur J Nutr.* 2020;59(2):609-619. doi:10.1007/s00394-019-01929-2
63. Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P, Petocz P. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(4):510-515. doi:10.1093/ajcn/74.4.510
64. Rawal P, Zhao L. Sialometabolism in Brain Health and Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2021;15. <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2021.648617>
65. Wang B, Yu B, Karim M, et al. Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. *Matern Nutr Optim Infant Feed Pract.* 2007;85(2):561-569. doi:10.1093/ajcn/85.2.561
66. Wickramasinghe S, Medrano JF. Primer on genes encoding enzymes in sialic acid metabolism in mammals. *Biochimie.* 2011;93(10):1641-1646. doi:10.1016/j.biochi.2011.06.002
67. Akella NM, Ciraku L, Reginato MJ. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC Biol.* 2019;17(1):52. doi:10.1186/s12915-019-0671-3
68. Chou WK, Hinderlich S, Reutter W, Tanner ME. Sialic acid biosynthesis: Stereochemistry and mechanism of the reaction catalyzed by the mammalian UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase. *J Am Chem Soc.* 2003;125(9):2455-2461. doi:10.1021/ja021309g
69. Carrillo N, Malicdan MC, Leoyklang P, et al. Safety and efficacy of N-acetylmannosamine (ManNAc) in patients with GNE myopathy: an open-label phase 2 study. *Genet Med.* 2021;23(11):2067-2075. doi:10.1038/s41436-021-01259-x
70. Hagenhaus V, Gorenflos López JL, Rosenstengel R, et al. Glycation Interferes with the Activity of the Bi-Functional UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase/N-Acetyl-mannosamine Kinase (GNE). *Biomolecules.* 2023;13(3):3. doi:10.3390/biom13030422
71. Glaser L. On the mechanism of N-acetylmannosamine formation. *Biochim Biophys Acta.* 1960;41(3):534-536. doi:10.1016/0006-3002(60)90056-1
72. Comb DG, Roseman S. Enzymic synthesis of N-acetyl-D-mannosamine. *Biochim Biophys Acta.* 1958;29(3):653-654. doi:10.1016/0006-3002(58)90031-3
73. Hinderlich S, Weidemann W, Yardeni T, Horstkorte R, Huizing M. UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE), a master regulator of sialic acid synthesis. *Top Curr Chem.* 2015;366:97-137. doi:10.1007/128_2013_464
74. Willems AP, Sun L, Schulz MA, et al. Activity of N-acylneuraminate-9-phosphatase (NANP) is not essential for de novo sialic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2019;1863(10):1471-1479. doi:10.1016/j.bbagen.2019.05.011

75. Teoh ST, Ogrodzinski MP, Ross C, Hunter KW, Lunt SY. Sialic acid metabolism: A key player in breast cancer metastasis revealed by metabolomics. *Front Oncol*. 2018;8(MAY):1-15. doi:10.3389/fonc.2018.00174
76. Kozutsumi Y, Kawano T, Yamakawa T, Suzuki A. Participation of Cytochrome b5 in CMP-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylation in Mouse Liver Cytosol1. *J Biochem (Tokyo)*. 1990;108(5):704-706. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123268
77. Kawano T, Kozutsumi Y, Takematsu H, Kawasaki T, Suzuki A. Regulation of biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid-containing glycoconjugates: characterization of factors required for NADH-dependent cytidine 5'monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylation. *Glycoconj J*. 1993;10(1):109-115. doi:10.1007/BF00731194
78. Li Y, Chen X. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;94(4):887-905. doi:10.1007/s00253-012-4040-1
79. Schauer R, Kelm S, Reuter G, Roggentin P, Shaw L. Biochemistry and Role of Sialic Acids. In: Rosenberg A, ed. *Biology of the Sialic Acids*. Springer US; 1995:7-67. doi:10.1007/978-1-4757-9504-2_2
80. Jastrzab P, Narejko K, Car H, Wielgat P. Cell Membrane Sialome: Sialic Acids as Therapeutic Targets and Regulators of Drug Resistance in Human Cancer Management. *Cancers*. 2023;15(20):5103. doi:10.3390/cancers15205103
81. Ji W, Sun W, Feng J, et al. Characterization of a novel N-acetylneuraminic acid lyase favoring industrial N-acetylneuraminic acid synthesis process. *Sci Rep*. 2015;5(1):9341. doi:10.1038/srep09341
82. Angata T, Nakata D, Matsuda T, Kitajima K, Troy FA. Biosynthesis of KDN (2-Keto-3-deoxy-d-glycero -d-galacto -nononic acid). *J Biol Chem*. 1999;274(33):22949-22956. doi:10.1074/jbc.274.33.22949
83. Crich D, Navuluri C. Practical Synthesis of 2-Keto-3-deoxy-D- glycero-D- galactononulosonic Acid (KDN). *Org Lett*. 2011;13(23):6288-6291. doi:10.1021/ol202773t
84. Kawanishi K, Saha S, Diaz S, et al. Evolutionary conservation of human ketodeoxynonulosonic acid production is independent of sialoglycan biosynthesis. *J Clin Invest*. 2021;131(5):e137681. doi:10.1172/JCI137681
85. Saha S, Coady A, Sasmal A, et al. Exploring the Impact of Ketodeoxynonulosonic Acid in Host-Pathogen Interactions Using Uptake and Surface Display by Nontypeable Haemophilus influenzae. Feldman MF, Doering TL, eds. *mBio*. 2021;12(1):e03226-20. doi:10.1128/mBio.03226-20
86. Karnebeek CDMV, Bonafé L, Wen XY, et al. NANS-mediated synthesis of sialic acid is required for brain and skeletal development. *Nat Genet* 2016 487. 2016;48(7):777-784. doi:10.1038/ng.3578

87. Mori-Yoshimura M, Oya Y, Yajima H, et al. GNE myopathy: A prospective natural history study of disease progression. *Neuromuscul Disord*. 2014;24(5):380-386. doi:10.1016/j.nmd.2014.02.008
88. Ferreira CR, Gahl WA. Lysosomal storage diseases. *Transl Sci Rare Dis*. 2017;2(1-2):1-71. doi:10.3233/TRD-160005
89. Carrillo N, Malicdan MC, Huizing M. GNE Myopathy: Etiology, Diagnosis, and Therapeutic Challenges. *Neurotherapeutics*. 2018;15(4):900-914. doi:10.1007/s13311-018-0671-y
90. Cho A, Christine M, Malicdan V, et al. Sialic acid deficiency is associated with oxidative stress leading to muscle atrophy and weakness in GNE myopathy. *Hum Mol Genet*. 2017;26(16):3081-3093. doi:10.1093/hmg/ddx192
91. Xu X, Wang AQ, Latham LL, et al. Safety, pharmacokinetics and sialic acid production after oral administration of N -acetylmannosamine (ManNAc) to subjects with GNE myopathy. *Mol Genet Metab*. 2017;122(1-2):126-134. doi:10.1016/j.ymgme.2017.04.010
92. Liu L, Lee WS, Doray B, Kornfeld S. Engineering of GlcNAc-1-Phosphotransferase for Production of Highly Phosphorylated Lysosomal Enzymes for Enzyme Replacement Therapy. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2017;5:59-65. doi:10.1016/j.omtm.2017.03.006
93. Ito M. 3.11 - Degradation of Glycolipids. In: Kamerling H, ed. *Comprehensive Glycoscience*. Elsevier; 2007:193-208. doi:10.1016/B978-044451967-2/00044-1
94. Xiao C, Toro C, Tifft C. GM2 Activator Deficiency. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, eds. *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed January 23, 2025. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583219/>
95. Chapleau A, Mirchi A, Tran LT, Poulin C, Bernard G. Longitudinal Characterization of the Clinical Course of Intermediate-Severe Salla Disease. *Pediatr Neurol*. 2023;148:133-137. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2023.08.013
96. Ferreira CR, Gahl WA. Lysosomal storage diseases. *Transl Sci Rare Dis*. 2017;2(1-2):1-71. doi:10.3233/TRD-160005
97. Schauer R, Kamerling JP. Exploration of the Sialic Acid World. In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Vol 75. Elsevier; 2018:1-213. doi:10.1016/bs.accb.2018.09.001
98. Tietze F, Seppala R, Renlund M, et al. Defective lysosomal egress of free sialic acid (N-acetylneuraminic acid) in fibroblasts of patients with infantile free sialic acid storage disease*. *J Biol Chem*. 1989;264(26):15316-15322. doi:10.1016/S0021-9258(19)84828-7
99. Adams D, Wasserstein M. Free Sialic Acid Storage Disorders. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, eds. *GeneReviews®*. University of

- Washington, Seattle; 1993. Accessed January 23, 2025.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1470/>
100. Huizing M, Hackbarth ME, Adams DR, et al. Free sialic acid storage disorder: Progress and promise. *Neurosci Lett*. 2021;755:135896. doi:10.1016/j.neulet.2021.135896
 101. Sabir MS, Leoyklang P, Hackbarth ME, et al. Generation and characterization of two iPSC lines derived from subjects with Free Sialic Acid Storage Disorder (FSASD). *Stem Cell Res*. 2024;81:103600. doi:10.1016/j.scr.2024.103600
 102. Barmherzig R, Bullivant G, Cordeiro D, Sinasac DS, Blaser S, Mercimek-Mahmutoglu S. A New Patient With Intermediate Severe Salla Disease With Hypomyelination: A Literature Review for Salla Disease. *Pediatr Neurol*. 2017;74:87-91.e2. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2017.05.022
 103. Adams D, Wasserstein M. Free Sialic Acid Storage Disorders. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, eds. *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed January 23, 2025.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1470/>
 104. Barmherzig R, Bullivant G, Cordeiro D, Sinasac DS, Blaser S, Mercimek-Mahmutoglu S. A New Patient With Intermediate Severe Salla Disease With Hypomyelination: A Literature Review for Salla Disease. *Pediatr Neurol*. 2017;74:87-91.e2. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2017.05.022
 105. Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, et al. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2003;100(21):12045-12050. doi:10.1073/pnas.2131556100
 106. Nöhle U, Schauer R. Metabolism of Sialic Acids from Exogeneously Administered Sialyllactose and Mucin in Mouse and Rat. 1984;365(2):1457-1468. doi:10.1515/bchm2.1984.365.2.1457
 107. Jahan M, Thomson PC, Wynn PC, Wang B. Red Meat Derived Glycan, N-acetylneuraminic Acid (Neu5Ac) Is a Major Sialic Acid in Different Skeletal Muscles and Organs of Nine Animal Species—A Guideline for Human Consumers. *Foods*. 2023;12(2). doi:10.3390/foods12020337
 108. Samraj AN, Läubli H, Varki N, Varki A. Involvement of a Non-Human Sialic Acid in Human Cancer. *Front Oncol*. 2014;4(February):1-13. doi:10.3389/fonc.2014.00033
 109. Yao HL, Conway LP, Wang MM, Huang K, Liu L, Voglmeir J. Quantification of sialic acids in red meat by UPLC-FLD using indoxylsialosides as internal standards. *Glycoconj J*. 2016;33(2):219-226. doi:10.1007/s10719-016-9659-1
 110. Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A. Mechanism of Uptake and Incorporation of the Non-human Sialic Acid N-Glycolylneuraminic Acid into Human Cells*,. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4228-4237. doi:10.1074/jbc.M412040200

111. Dhar C, Sasmal A, Varki A. From “Serum Sickness” to “Xenosialitis”: Past, Present, and Future Significance of the Non-human Sialic Acid Neu5Gc. *Front Immunol.* 2019;10(April):807-807. doi:10.3389/fimmu.2019.00807
112. M Sroga J, H Wu D, Ma F, et al. Detection of the dietary xenoglycan N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) and anti-Neu5Gc antibodies within reproductive tracts of male and female infertility subjects. *Clin Obstet Gynecol Reprod Med.* 2015;1(3):72-78. doi:10.15761/COGRM.1000120
113. Leviatan Ben-Arye S, Yu H, Chen X, Padler-Karavani V. Profiling Anti-Neu5Gc IgG in Human Sera with a Sialoglycan Microarray Assay. *J Vis Exp.* 2017;(125):1-10. doi:10.3791/56094
114. Padler-karavani V, Yu H, Cao H, Karp F, Varki N, Chen X. Diversity in specificity , abundance , and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans : Potential implications for disease. *Glycobiology.* 2008;18(10):818-830. doi:10.1093/glycob/cwn072
115. Tran C, Turolla L, Ballhausen D, et al. The fate of orally administered sialic acid: First insights from patients with N-acetylneuraminic acid synthase deficiency and control subjects. *Mol Genet Metab Rep.* 2021;28:100777. doi:10.1016/j.ymgmr.2021.100777
116. Soares CO, Grosso AS, Ereño-Orbea J, Coelho H, Marcelo F. Molecular Recognition Insights of Sialic Acid Glycans by Distinct Receptors Unveiled by NMR and Molecular Modeling. *Front Mol Biosci.* 2021;8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.727847>
117. Wang B, Brand-Miller J. The role and potential of sialic acid in human nutrition. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57(11):1351-1369. doi:10.1038/sj.ejcn.1601704
118. Zeleny R, Kolarich D, Strasser R, Altmann F. Sialic acid concentrations in plants are in the range of inadvertent contamination. *Planta.* 2006;224(1):222-227. doi:10.1007/s00425-005-0206-8
119. Ylönen A, Kalkkinen N, Saarinen J, Bøgwald J, Helin J. Glycosylation analysis of two cysteine proteinase inhibitors from Atlantic salmon skin: di-O-acetylated sialic acids are the major sialic acid species on N-glycans. *Glycobiology.* 2001;11(7):523-531. doi:10.1093/glycob/11.7.523
120. Bashir S, Fezeu LK, Leviatan Ben-Arye S, et al. Association between Neu5Gc carbohydrate and serum antibodies against it provides the molecular link to cancer: French NutriNet-Santé study. *BMC Med.* 2020;18(1):1-19. doi:10.1186/s12916-020-01721-8
121. Altman MO, Gagneux P. Absence of Neu5Gc and Presence of Anti-Neu5Gc Antibodies in Humans-An Evolutionary Perspective. *Front Immunol.* 2019;10:789-789. doi:10.3389/fimmu.2019.00789

122. Schauer R, Srinivasan GV, Coddeville B, Zanetta JP, Guérardel Y. Low incidence of N-glycolylneuraminic acid in birds and reptiles and its absence in the platypus. *Carbohydr Res.* 2009;344(12):1494-1500. doi:10.1016/j.carres.2009.05.020
123. Peri S, Kulkarni A, Feyertag F, Berninsone PM, Alvarez-Ponce D. Phylogenetic Distribution of CMP-Neu5Ac Hydroxylase (CMAH), the Enzyme Synthetizing the Proinflammatory Human Xenoantigen Neu5Gc. *Genome Biol Evol.* 2018;10(1):207-219. doi:10.1093/gbe/evx251
124. Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(5):323-335. doi:10.1038/nrmicro2746
125. Tannock Gerald W. Modulating the Gut Microbiota of Humans by Dietary Intervention with Plant Glycans. *Appl Environ Microbiol.* 2021;87(6):e02757-20. doi:10.1128/AEM.02757-20
126. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(3):473-493. doi:10.1007/s00018-018-2943-4
127. El-Sayed A, Aleya L, Kamel M. Microbiota's role in health and diseases. *Environ Sci Pollut Res.* 2021;28(28):36967-36983. doi:10.1007/s11356-021-14593-z
128. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2. doi:10.3389/fcimb.2012.00104
129. Cronin P, Joyce SA, O'Toole PW, O'Connor EM. Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. *Nutrients.* 2021;13(5). doi:10.3390/nu13051655
130. Heimann E, Nyman M, Degerman E. Propionic acid and butyric acid inhibit lipolysis and de novo lipogenesis and increase insulin-stimulated glucose uptake in primary rat adipocytes. *Adipocyte.* 2015;4(2):81-88. doi:10.4161/21623945.2014.960694
131. Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol.* 2017;18(1):2. doi:10.1186/s12865-016-0187-3
132. Coker JK, Moyne O, Rodionov DA, Zengler K. Carbohydrates great and small, from dietary fiber to sialic acids: How glycans influence the gut microbiome and affect human health. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1869502. doi:10.1080/19490976.2020.1869502
133. Butler TL, Gary E Fraser, Beeson WL, et al. Cohort Profile: The Adventist Health Study-2 (AHS-2). *Int J Epidemiol.* 2008;37(2):260-265. doi:10.1093/ije/dym165
134. Davey GK, Spencer EA, Appleby PN, Allen NE, Knox KH, Key TJ. EPIC—Oxford: lifestyle characteristics and nutrient intakes in a cohort of 33 883 meat-eaters and 31 546 non meat-eaters in the UK. *Public Health Nutr.* 2003;6(3):259-268. doi:10.1079/PHN2002430

135. Englyst NA, Crook MA, Lumb P, et al. Percentage of body fat and plasma glucose predict plasma sialic acid concentration in type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2006;55(9):1165-1170. doi:10.1016/j.metabol.2006.04.014
136. Wakabayashi I, Masuda H. Relation of serum sialic acid to blood coagulation activity in type 2 diabetes: *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002;13(8):691-696. doi:10.1097/00001721-200212000-00004
137. Tian H, Liu Q, Qin S, et al. Synthesis and cardiovascular protective effects of quercetin 7-O-sialic acid. *J Cell Mol Med*. 2017;21(1):107-120. doi:10.1111/jcmm.12943
138. Demina EP, Smutova V, Pan X, et al. Neuraminidases 1 and 3 Trigger Atherosclerosis by Desialylating Low-Density Lipoproteins and Increasing Their Uptake by Macrophages. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(4). doi:10.1161/JAHA.120.018756
139. Samraj AN, Bertrand KA, Luben R, et al. Polyclonal human antibodies against glycans bearing red meat-derived non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid are stable, reproducible, complex and vary between individuals: Total antibody levels are associated with colorectal cancer risk. *Plos One*. 2018;13(6):e0197464. doi:10.1371/journal.pone.0197464
140. Yabu M, Korekane H, Takahashi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Miyamoto Y. Accumulation of free Neu5Ac-containing complex-type N-glycans in human pancreatic cancers. *Glycoconj J*. 2013;30(3):247-256. doi:10.1007/s10719-012-9435-9
141. Cornelissen LAM, Blanas A, van der Horst JC, et al. Disruption of sialic acid metabolism drives tumor growth by augmenting CD8 + T cell apoptosis. *Int J Cancer*. 2019;144(9):2290-2302. doi:10.1002/ijc.32084
142. Zaramela LS, Martino C, Alisson-Silva F, et al. Gut bacteria responding to dietary change encode sialidases that exhibit preference for red meat-associated carbohydrates. *Nat Microbiol*. 2019;4(12):2082-2089. doi:10.1038/s41564-019-0564-9
143. McDonald ND, Boyd EF. Structural and Biosynthetic Diversity of Nonulosonic Acids (NulOs) That Decorate Surface Structures in Bacteria. *Trends Microbiol*. 2021;29(2):142-157. doi:10.1016/j.tim.2020.08.002
144. Owen CD, Tailford LE, Monaco S, et al. Unravelling the specificity and mechanism of sialic acid recognition by the gut symbiont *Ruminococcus gnavus*. *Nat Commun*. 2017;8(1). doi:10.1038/s41467-017-02109-8
145. Bell A, Severi E, Lee M, et al. Uncovering a novel molecular mechanism for scavenging sialic acids in bacteria. *J Biol Chem*. 2020;295(40):13724-13736. doi:10.1074/jbc.RA120.014454
146. Aruni Wilson, Vanterpool Elaine, Osbourne Devon, et al. Sialidase and Sialoglycoproteases Can Modulate Virulence in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2011;79(7):2779-2791. doi:10.1128/IAI.00106-11

147. Jennings MP, Day CJ, Atack JM. How bacteria utilize sialic acid during interactions with the host: snip, snatch, dispatch, match and attach: This article is part of the Bacterial Cell Envelopes collection. *Microbiology*. 2022;168(3). doi:10.1099/mic.0.001157
148. Dedola S, Ahmadipour S, Andrade P de, et al. Sialic acids in infection and their potential use in detection and protection against pathogens. *RSC Chem Biol*. 2023;5(3):167. doi:10.1039/d3cb00155e
149. Cavalcante T, Medeiros MM, Mule SN, Palmisano G, Stolf BS. The Role of Sialic Acids in the Establishment of Infections by Pathogens, With Special Focus on Leishmania. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11. doi:https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.671913
150. Matrosovich M, Herrler G, Klenk HD. Sialic Acid Receptors of Viruses. *SialoGlyco Chem Biol II*. 2013;367:1. doi:10.1007/128_2013_466
151. Burzyńska P, Sobala Ł, Mikołajczyk K, Jodłowska M, Jaśkiewicz E. Sialic Acids as Receptors for Pathogens. *Biomolecules*. 2021;11(6):831. doi:10.3390/biom11060831
152. Tolia NH, Enemark EJ, Sim BKL, Joshua-Tor L. Structural Basis for the EBA-175 Erythrocyte Invasion Pathway of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum. *Cell*. 2005;122(2):183-193. doi:10.1016/j.cell.2005.05.033
153. Morrot A, Villar SR, González FB, Pérez AR. Evasion and Immuno-Endocrine Regulation in Parasite Infection: Two Sides of the Same Coin in Chagas Disease? *Front Microbiol*. 2016;7. doi:https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00704
154. Coker JK, Moyne O, Rodionov DA, Zengler K. Carbohydrates great and small, from dietary fiber to sialic acids: How glycans influence the gut microbiome and affect human health. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1869502. doi:10.1080/19490976.2020.1869502
155. Both P, Riese M, Gray CJ, et al. Applications of a highly α 2,6-selective pseudosialidase. *Glycobiology*. 2018;28(5):261-268. doi:10.1093/glycob/cwy016
156. Haines-Menges Brandy L., Whitaker W. Brian, Lubin J.B., Boyd E. Fidelma. Host Sialic Acids: A Delicacy for the Pathogen with Discerning Taste. *Microbiol Spectr*. 2015;3(4):3.4.07. doi:10.1128/microbiolspec.MBP-0005-2014
157. Liu F, Dong Q, Myers AM, Fromm HJ. Expression of human brain hexokinase in Escherichiacoli: Purification and characterization of the expressed enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;177(1):305-311. doi:10.1016/0006-291X(91)91983-J
158. Bell A, Severi E, Owen CD, Latousakis D, Juge N. Biochemical and structural basis of sialic acid utilization by gut microbes. *J Biol Chem*. 2023;299(3):102989. doi:10.1016/j.jbc.2023.102989
159. Zhao M, Zhu Y, Wang H, Zhang W, Mu W. Recent advances on N-acetylneuraminic acid: Physiological roles, applications, and biosynthesis. *Synth Syst Biotechnol*. 2023;8(3):509-519. doi:10.1016/j.synbio.2023.06.009

160. Lin BX, Qiao Y, Shi B, Tao Y. Polysialic acid biosynthesis and production in *Escherichia coli*: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(1):1-8. doi:10.1007/s00253-015-7019-x
161. Feng Y, Cao M, Shi J, et al. Attenuation of *Streptococcus suis* virulence by the alteration of bacterial surface architecture. *Sci Rep*. 2012;2(1):710. doi:10.1038/srep00710
162. Rodríguez-Díaz J, Rubio-del-Campo A, Yebra MJ. Regulatory insights into the production of UDP-N-acetylglucosamine by *Lactobacillus casei*. *Bioengineered*. 2012;3(6):339-342. doi:10.4161/bioe.21271
163. Ko TP, Lai SJ, Hsieh TJ, Yang CS, Chen Y. The tetrameric structure of sialic acid–synthesizing UDP-GlcNAc 2-epimerase from *Acinetobacter baumannii*: A comparative study with human GNE. *J Biol Chem*. 2018;293(26):10119-10127. doi:10.1074/jbc.RA118.001971
164. Zapata G, Crowley J M, Vann W F. Sequence and expression of the *Escherichia coli* K1 neuC gene product. *J Bacteriol*. 1992;174(1):315-319. doi:10.1128/jb.174.1.315-319.1992
165. Vimr E R, Aaronson W, Silver R P. Genetic analysis of chromosomal mutations in the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol*. 1989;171(2):1106-1117. doi:10.1128/jb.171.2.1106-1117.1989
166. Silver RP, Vann WF, Aaronson W. Genetic and Molecular Analyses of *Escherichia coli* KI Antigen Genes. *J Bacteriol*. 1984;157.
167. Vimr ER, Kalivoda KA, Deszo EL, Steenbergen SM. Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(1):132-153. doi:10.1128/mmbr.68.1.132-153.2004
168. Vimr E, Lichtensteiger C, Steenbergen S. Sialic acid metabolism's dual function in *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol*. 2000;36(5):1113-1123. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01925.x
169. Flack EKP, Chidwick HS, Best M, Thomas GH, Fascione MA. Synthetic Approaches for Accessing Pseudaminic Acid (Pse) Bacterial Glycans. *ChemBioChem*. 2020;21(10):1397-1407. doi:10.1002/cbic.202000019
170. Chidwick HS, Flack EKP, Keenan T, Walton J, Thomas GH, Fascione MA. Reconstitution and optimisation of the biosynthesis of bacterial sugar pseudaminic acid (Pse5Ac7Ac) enables preparative enzymatic synthesis of CMP-Pse5Ac7Ac. *Sci Rep*. 2021;11(1):4756. doi:10.1038/s41598-021-83707-x
171. Wei R, Liu H, Li X. De novo synthesis of novel bacterial monosaccharide fusaminic acid. *J Antibiot (Tokyo)*. 2019;72(6):420-431. doi:10.1038/s41429-019-0170-3

172. Kenyon JJ, Marzaioli AM, De Castro C, Hall RM. 5,7-di-N-acetyl-acinetaminic acid: A novel non-2-ulosonic acid found in the capsule of an *Acinetobacter baumannii* isolate. *Glycobiology*. 2015;25(6):644-654. doi:10.1093/glycob/cwv007
173. Hassan MI, Lundgren BR, Chaumun M, et al. Total Biosynthesis of Legionaminic Acid, a Bacterial Sialic Acid Analogue. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016;55(39):12018-12021. doi:10.1002/anie.201606006
174. Tomás-Martínez S, Kleikamp HBC, Neu TR, et al. Production of nonulosonic acids in the extracellular polymeric substances of “*Candidatus Accumolibacter phosphatis*.” *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105(8):3327-3338. doi:10.1007/s00253-021-11249-3
175. Eke PI, Borgnakke WS, Genco RJ. Recent epidemiologic trends in periodontitis in the USA. *Periodontol 2000*. 2020;82(1):257-267. doi:10.1111/prd.12323
176. Yu S, Fan X, Zheng S, et al. The sialidase inhibitor, DANA, reduces *Porphyromonas gingivalis* pathogenicity and exerts anti-inflammatory effects: An in vitro and in vivo experiment. *J Periodontol*. 2021;92(2):286-297. doi:10.1002/JPER.19-0688
177. Bostanci N, Bao K, Greenwood D, Silbereisen A, Belibasakis GN. Chapter Six - Periodontal disease: From the lenses of light microscopy to the specs of proteomics and next-generation sequencing. In: Makowski GS, ed. *Advances in Clinical Chemistry*. Vol 93. Elsevier; 2019:263-290. doi:10.1016/bs.acc.2019.07.006
178. Chen WA, Fletcher HM, Gheorghe JD, Oyoyo U, Boskovic DS. Platelet plug formation in whole blood is enhanced in the presence of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol*. 2020;35(6):251-259. doi:10.1111/omi.12314
179. Chen WA, Fletcher HM, Payne KJ, et al. Platelet and neutrophil responses to *Porphyromonas gingivalis* in human whole blood. *Mol Oral Microbiol*. 2021;36(3):202-213. doi:10.1111/omi.12336
180. Frey AM, Satur MJ, Phansopa C, et al. Characterization of *Porphyromonas gingivalis* sialidase and disruption of its role in host–pathogen interactions. *Microbiology*. 2019;165(11):1181-1197. doi:10.1099/mic.0.000851
181. Chen WA, Dou Y, Fletcher HM, Boskovic DS. Local and Systemic Effects of *Porphyromonas gingivalis* Infection. *Microorganisms*. 2023;11(2). doi:10.3390/microorganisms11020470
182. Lamont Richard J., Jenkinson Howard F. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1244-1263. doi:10.1128/MMBR.62.4.1244-1263.1998
183. Nemoto TK, Ohara-Nemoto Y. Exopeptidases and gingipains in *Porphyromonas gingivalis* as prerequisites for its amino acid metabolism. *Jpn Dent Sci Rev*. 2016;52(1):22-29. doi:10.1016/j.jdsr.2015.08.002

184. Moradali MF, Davey ME. Metabolic plasticity enables lifestyle transitions of *Porphyromonas gingivalis*. *Npj Biofilms Microbiomes*. 2021;7(1):46. doi:10.1038/s41522-021-00217-4
185. Nakayama M, Ohara N. Molecular mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*-host cell interaction on periodontal diseases. *Jpn Dent Sci Rev*. 2017;53(4):134-140. doi:10.1016/j.jdsr.2017.06.001
186. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, et al. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. Riera CM, ed. *J Immunol Res*. 2014;2014:476068. doi:10.1155/2014/476068
187. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):57-80. doi:10.1111/prd.12002
188. Werheim ER, Senior KG, Shaffer CA, Cuadra GA. Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis* Can Escape Phagocytosis of Mammalian Macrophages. *Microorganisms*. 2020;8(9). doi:10.3390/microorganisms8091432
189. Cueno ME, Kamio N, Imai K, Ohya M, Tamura M, Ochiai K. Structural Significance of the β 1K396 Residue Found in the *Porphyromonas gingivalis* Sialidase β -Propeller Domain: A Computational Study with Implications for Novel Therapeutics Against Periodontal Disease. *OMICS J Integr Biol*. 2014;18(9):591-599. doi:10.1089/omi.2013.0152
190. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(6):355-367. doi:10.1038/s41579-018-0001-8
191. Loughran AJ, Orihuela CJ, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. *Microbiol Spectr*. 7(2):10.1128/microbiolspec.gpp3-0004-2018. doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0004-2018
192. Xiao A, Slack TJ, Li Y, et al. *Streptococcus pneumoniae* Sialidase SpNanB-Catalyzed One-Pot Multienzyme (OPME) Synthesis of 2,7-Anhydro-Sialic acids as Selective Sialidase Inhibitors. *J Org Chem*. 2018;83(18):10798-10804. doi:10.1021/acs.joc.8b01519
193. Hentrich K, Löffling J, Pathak A, Nizet V, Varki A, Henriques-Normark B. *Streptococcus pneumoniae* Senses a Human-like Sialic Acid Profile via the Response Regulator CiaR. *Cell Host Microbe*. 2016;20(3):307-317. doi:10.1016/j.chom.2016.07.019
194. Versluys KA, Eurich DT, Marrie TJ, Forgie S, Tyrrell GJ. Invasive pneumococcal disease and long-term outcomes in children: A 20-year population cohort study. *Lancet Reg Health - Am*. 2022;14:100341. doi:10.1016/j.lana.2022.100341
195. Werren JP, Troxler LJ, Oyewole OR, et al. Carbon Source-Dependent Changes of the Structure of *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharide with Serotype 6F. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):9. doi:10.3390/ijms22094580

196. Mathew BJ, Gupta P, Naaz T, et al. Role of *Streptococcus pneumoniae* extracellular glycosidases in immune evasion. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13. doi:10.3389/fcimb.2023.1109449
197. Trappetti C, Kadioglu A, Carter M, et al. Sialic acid: a preventable signal for pneumococcal biofilm formation, colonization, and invasion of the host. *J Infect Dis.* 2009;199(10):1497-1505. doi:10.1086/598483
198. Manco S, Hernon F, Yesilkaya H, Paton JC, Andrew PW, Kadioglu A. Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. *Infect Immun.* 2006;74(7):4014-4020. doi:10.1128/IAI.01237-05
199. Xu G, Kiefel MJ, Wilson JC, Andrew PW, Oggioni MR, Taylor GL. Three *Streptococcus pneumoniae* sialidases: three different products. *J Am Chem Soc.* 2011;133(6):1718-1721. doi:10.1021/ja110733q
200. Agarwal HS, Latifi SQ. *Streptococcus Pneumoniae*-Associated Hemolytic Uremic Syndrome in the Era of Pneumococcal Vaccine. *Pathogens.* 2021;10(6):727. doi:10.3390/pathogens10060727
201. Duell BL, Su YC, Riesbeck K. Host–pathogen interactions of nontypeable *Haemophilus influenzae*: from commensal to pathogen. *FEBS Lett.* 2016;590(21):3840-3853. doi:10.1002/1873-3468.12351
202. Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species *hemophilus influenzae*. *J Exp Med.* 1931;53(4):471-492. doi:10.1084/jem.53.4.471
203. Ng PSK, Day CJ, Attack JM, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* Has Evolved Preferential Use of N-Acetylneuraminic Acid as a Host Adaptation. *mBio.* 2019;10(3):10.1128/mbio.00422-19. doi:10.1128/mbio.00422-19
204. Paulo AC, Lança J, Almeida ST, Hilty M, Sá-Leão R. The upper respiratory tract microbiota of healthy adults is affected by *Streptococcus pneumoniae* carriage, smoking habits, and contact with children. *Microbiome.* 2023;11(1):199. doi:10.1186/s40168-023-01640-9
205. Langereis JD, de Jonge MI. Invasive Disease Caused by Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(10):1711-1718. doi:10.3201/eid2110.150004
206. Landwehr KR, Granland CM, Martinovich KM, et al. An infant mouse model of influenza-driven nontypeable *Haemophilus influenzae* colonization and acute otitis media suitable for preclinical testing of novel therapies. *Infect Immun.* Published online May 7, 2024. doi:10.1128/iai.00453-23
207. Oliver SE, Rubis AB, Soeters HM, et al. Epidemiology of Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae* Disease—United States, 2008–2019. *Clin Infect Dis.* 2023;76(11):1889-1895. doi:10.1093/cid/ciad054

208. Van Eldere J, Slack MPE, Ladhani S, Cripps AW. Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognised pathogen. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(12):1281-1292. doi:10.1016/S1473-3099(14)70734-0
209. Collins S, Litt DJ, Flynn S, Ramsay ME, Slack MPE, Ladhani SN. Neonatal Invasive *Haemophilus influenzae* Disease in England and Wales: Epidemiology, Clinical Characteristics, and Outcome. *Clin Infect Dis*. 2015;60(12):1786-1792. doi:10.1093/cid/civ194
210. Phillips ZN, Brizuela C, Jennison AV, et al. Analysis of Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae* Isolates Reveals Selection for the Expression State of Particular Phase-Variable Lipooligosaccharide Biosynthetic Genes. *Infect Immun*. 2019;87(5):e00093-19. doi:10.1128/IAI.00093-19
211. Ladhani S, Slack MPE, Heath PT, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996-2006. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(3):455-463. doi:10.3201/eid1603.090290
212. Kariminik A, Baseri-Salehi M, Kheirkhah B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. *Immunol Lett*. 2017;190:1-6. doi:10.1016/j.imlet.2017.07.002
213. Khatua B, Ghoshal A, Bhattacharya K, et al. Sialic acids acquired by *Pseudomonas aeruginosa* are involved in reduced complement deposition and siglec mediated host-cell recognition. *Febs Lett*. 2010;584(3):555-561. doi:10.1016/j.febslet.2009.11.087
214. Avril T, Wagner ER, Willison HJ, Crocker PR. Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 7 mediates selective recognition of sialylated glycans expressed on *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides. *Infect Immun*. 2006;74(7):4133-4141. doi:10.1128/IAI.02094-05
215. Carlin AF, Lewis AL, Varki A, Nizet V. Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J Bacteriol*. 2007;189(4):1231-1237. doi:10.1128/JB.01155-06
216. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(4):255-266. doi:10.1038/nri2056
217. Camargo A, Ramírez JD, Kiu R, Hall LJ, Muñoz M. Unveiling the pathogenic mechanisms of *Clostridium perfringens* toxins and virulence factors. *Emerg Microbes Infect*. 2024;13(1):2341968. doi:10.1080/22221751.2024.2341968
218. Li J, Sayeed S, Robertson S, Chen J, McClane BA. Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type D strain CN3718. *PLoS Pathog*. 2011;7(12):e1002429. doi:10.1371/journal.ppat.1002429
219. Yao PY, Annamaraju P. *Clostridium perfringens* Infection. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2025. Accessed January 21, 2025. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559049/>

220. Wang Y hua. Sialidases From *Clostridium perfringens* and Their Inhibitors. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;9. doi:10.3389/fcimb.2019.00462
221. Schauer R, Sommer U, Krüger D, van Unen H, Traving C. The Terminal Enzymes of Sialic Acid Metabolism: Acylneuraminate Pyruvate-Lyases. *Biosci Rep.* 1999;19(5):373-383. doi:10.1023/A:1020256004616
222. Li J, Uzal FA, McClane BA. *Clostridium perfringens* Sialidases: Potential Contributors to Intestinal Pathogenesis and Therapeutic Targets. *Toxins.* 2016;8(11):341. doi:10.3390/toxins8110341
223. Navarro MA, Li J, McClane BA, Morrell E, Beingesser J, Uzal FA. NanI Sialidase Is an Important Contributor to *Clostridium perfringens* Type F Strain F4969 Intestinal Colonization in Mice. *Infect Immun.* 2018;86(12):10.1128/iai.00462-18. doi:10.1128/iai.00462-18
224. Wang Y hua. Sialidases From *Clostridium perfringens* and Their Inhibitors. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;9:462. doi:10.3389/fcimb.2019.00462
225. Belcher T, Rollier CS, Dold C, Ross JDC, MacLennan CA. Immune responses to *Neisseria gonorrhoeae* and implications for vaccine development. *Front Immunol.* 2023;14:1248613. doi:10.3389/fimmu.2023.1248613
226. Kirkcaldy RD, Weston E, Segurado AC, Hughes G. Epidemiology of gonorrhoea: a global perspective. *Sex Health.* 2019;16(5):401-411. doi:10.1071/SH19061
227. Cardenas AJ, Thomas KS, Broden MW, et al. *Neisseria gonorrhoeae* scavenges host sialic acid for Siglec-mediated, complement-independent suppression of neutrophil activation. *mBio.* 2024;15(5):e00119-24. doi:10.1128/mbio.00119-24
228. Handing JW, Criss AK. The lipooligosaccharide-modifying enzyme LptA enhances gonococcal defence against human neutrophils. *Cell Microbiol.* 2015;17(6):910-921. doi:10.1111/cmi.12411
229. Karwaski MF, Wakarchuk WW, Gilbert M. High-level expression of recombinant *Neisseria* CMP-sialic acid synthetase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2002;25(2):237-240. doi:10.1016/S1046-5928(02)00004-9
230. Gulati S, Cox A, Lewis LA, et al. Enhanced Factor H Binding to Sialylated Gonococci Is Restricted to the Sialylated Lacto-N-Neotetraose Lipooligosaccharide Species: Implications for Serum Resistance and Evidence for a Bifunctional Lipooligosaccharide Sialyltransferase in Gonococci. *Infect Immun.* 2005;73(11):7390-7397. doi:10.1128/iai.73.11.7390-7397.2005
231. Jen FEC, Ketterer MR, Semchenko EA, et al. The Lst Sialyltransferase of *Neisseria gonorrhoeae* Can Transfer Keto-Deoxyoctanoate as the Terminal Sugar of Lipooligosaccharide: a Glyco-Achilles Heel That Provides a New Strategy for Vaccines to Prevent Gonorrhea. *mBio.* 2021;12(2):10.1128/mbio.03666-20. doi:10.1128/mbio.03666-20

232. Nicholls JM, Moss RB, Haslam SM. The use of sialidase therapy for respiratory viral infections. *Antiviral Res.* 2013;98(3):401-409. doi:10.1016/j.antiviral.2013.04.012
233. Wallace LE, Liu M, van Kuppeveld FJM, de Vries E, de Haan CAM. Respiratory mucus as a virus-host range determinant. *Trends Microbiol.* 2021;29(11):983-992. doi:10.1016/j.tim.2021.03.014
234. Payne S. 3 - Virus interactions with the cell. In: Payne S, ed. *Viruses (Second Edition)*. Academic Press; 2023:25-37. doi:10.1016/B978-0-323-90385-1.00025-X
235. Reeves JD, Doms RW. CHAPTER 33 - The Role of Chemokine Receptors in HIV Infection of Host Cells. In: Bradshaw RA, Dennis EA, eds. *Handbook of Cell Signaling*. Academic Press; 2003:191-196. doi:10.1016/B978-012124546-7/50393-4
236. Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, Koppolu V, Vasigala V, Ebrahimpour S. A brief review of influenza virus infection. *J Med Virol.* 2021;93(8):4638-4646. doi:10.1002/jmv.26990
237. Hutchinson EC. Influenza Virus. *Trends Microbiol.* 2018;26(9):809-810. doi:10.1016/j.tim.2018.05.013
238. Kumlin U, Olofsson S, Dimock K, Arnberg N. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza Other Respir Viruses.* 2008;2(5):147-154. doi:10.1111/j.1750-2659.2008.00051.x
239. Hatakeyama S, Sakai-Tagawa Y, Kiso M, et al. Enhanced Expression of an α 2,6-Linked Sialic Acid on MDCK Cells Improves Isolation of Human Influenza Viruses and Evaluation of Their Sensitivity to a Neuraminidase Inhibitor. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4139-4146. doi:10.1128/JCM.43.8.4139-4146.2005
240. Chen Z, Chen W, Wang Q, et al. Comparative analysis of sialic acid α 2–3/6 galactose glycan-binding proteins in human saliva and serum. *J Mol Struct.* 2021;1230:129859. doi:10.1016/j.molstruc.2020.129859
241. Liu M, Huang LZ, Smits AA, et al. Human-type sialic acid receptors contribute to avian influenza A virus binding and entry by hetero-multivalent interactions. *Nat Commun.* 2022;13(1):4054. doi:10.1038/s41467-022-31840-0
242. Dawre S, Maru S. Human respiratory viral infections: Current status and future prospects of nanotechnology-based approaches for prophylaxis and treatment. *Life Sci.* 2021;278:119561. doi:10.1016/j.lfs.2021.119561
243. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primer.* 2018;4(1):3. doi:10.1038/s41572-018-0002-y
244. Sulpiana, Amalia R, Atik N. The Roles of Endocytosis and Autophagy at the Cellular Level During Influenza Virus Infection: A Mini-Review. *Infect Drug Resist.* 2024;17:3199-3208. doi:10.2147/IDR.S471204

245. McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol.* 2019;10. doi:10.3389/fmicb.2019.00039
246. Gallagher JR, McCraw DM, Torian U, et al. Characterization of Hemagglutinin Antigens on Influenza Virus and within Vaccines Using Electron Microscopy. *Vaccines.* 2018;6(2):2. doi:10.3390/vaccines6020031
247. Gottschalk A. The Influenza Virus Neuraminidase. *Nature.* 1958;181(4606):377-378. doi:10.1038/181377a0
248. Wu NC, Wilson IA. Influenza Hemagglutinin Structures and Antibody Recognition. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020;10(8):a038778. doi:10.1101/cshperspect.a038778
249. Fitz W, Rosenthal PB, Wong CH. Synthesis and inhibitory properties of a thiomethylmercuric sialic acid with application to the X-ray structure determination of 9-O-acetylsialic acid esterase from influenza C virus. *Bioorg Med Chem.* 1996;4(8):1349-1353. doi:10.1016/0968-0896(96)00123-x
250. Rossman JS, Leser GP, Lamb RA. Filamentous Influenza Virus Enters Cells via Macropinocytosis. *J Virol.* 2012;86(20):10950-10960. doi:10.1128/JVI.05992-11
251. Vries E de, Tscherne DM, Wienholts MJ, et al. Dissection of the Influenza A Virus Endocytic Routes Reveals Macropinocytosis as an Alternative Entry Pathway. *PLOS Pathog.* 2011;7(3):e1001329. doi:10.1371/journal.ppat.1001329
252. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *J Virol.* 2004;78(22):12665-12667. doi:10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004
253. Ohuchi M, Asaoka N, Sakai T, Ohuchi R. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes Infect.* 2006;8(5):1287-1293. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.008
254. Giurgea LT, Morens DM, Taubenberger JK, Memoli MJ. Influenza Neuraminidase: A Neglected Protein and Its Potential for a Better Influenza Vaccine. *Vaccines.* 2020;8(3):3. doi:10.3390/vaccines8030409
255. Matrosovich M, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *J Virol.* 2004;78(22):12665-12667. doi:10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004
256. Escuret V, Terrier O. Co-infection of the respiratory epithelium, scene of complex functional interactions between viral, bacterial, and human neuraminidases. *Front Microbiol.* 2023;14. doi:10.3389/fmicb.2023.1137336

257. Creytens S, Pascha MN, Ballegeer M, Saelens X, de Haan CAM. Influenza Neuraminidase Characteristics and Potential as a Vaccine Target. *Front Immunol.* 2021;12:786617. doi:10.3389/fimmu.2021.786617
258. Team E editorial. Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. *Eurosurveillance.* 2020;25(5):200131e. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.200131e
259. Majumder J, Minko T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. *AAPS J.* 2021;23(1):14. doi:10.1208/s12248-020-00532-2
260. Su S, Wong G, Shi W, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016;24(6):490-502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003
261. Zhu Na, Zhang Dingyu, Wang Wenling, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727-733. doi:10.1056/NEJMoa2001017
262. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020;367(6483):1260-1263. doi:10.1126/science.abb2507
263. Casalino L, Gaieb Z, Goldsmith JA, et al. Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Cent Sci.* 2020;6(10):1722-1734. doi:10.1021/acscentsci.0c01056
264. Tortorici MA, Walls AC, Lang Y, et al. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat Struct Mol Biol.* 2019;26(6):481-489. doi:10.1038/s41594-019-0233-y
265. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science.* 2020;367(6485):1444-1448. doi:10.1126/science.abb2762
266. Milanetti E, Miotto M, Di Rienzo L, et al. In-Silico Evidence for a Two Receptor Based Strategy of SARS-CoV-2. *Front Mol Biosci.* 2021;8. doi:10.3389/fmolb.2021.690655
267. Vandelli A, Monti M, Milanetti E, et al. Structural analysis of SARS-CoV-2 genome and predictions of the human interactome. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(20):11270-11283. doi:10.1093/nar/gkaa864
268. Pronker MF, Creutzmacher R, Drulyte I, et al. Sialoglycan binding triggers spike opening in a human coronavirus. *Nature.* 2023;624(7990):201-206. doi:10.1038/s41586-023-06599-z
269. Maity S, Acharya A. Many Roles of Carbohydrates: A Computational Spotlight on the Coronavirus S Protein Binding. *ACS Appl Bio Mater.* 2024;7(2):646-656. doi:10.1021/acsbm.2c01064

270. Awasthi M, Gulati S, Sarkar DP, et al. The Sialoside-Binding Pocket of SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Structurally Resembles MERS-CoV. *Viruses*. 2020;12(9):9. doi:10.3390/v12090909
271. Baker AN, Richards SJ, Guy CS, et al. The SARS-COV-2 Spike Protein Binds Sialic Acids and Enables Rapid Detection in a Lateral Flow Point of Care Diagnostic Device. *ACS Cent Sci*. 2020;6(11):2046-2052. doi:10.1021/acscentsci.0c00855
272. Nguyen L, McCord KA, Bui DT, et al. Sialic acid-containing glycolipids mediate binding and viral entry of SARS-CoV-2. *Nat Chem Biol*. 2022;18(1):81-90. doi:10.1038/s41589-021-00924-1
273. Cavezzi A, Menicagli R, Troiani E, Corrao S. COVID-19, Cation Dysmetabolism, Sialic Acid, CD147, ACE2, Viroporins, Hepcidin and Ferroptosis: A Possible Unifying Hypothesis. *F1000Research*. 2022;11:102. doi:10.12688/f1000research.108667.2
274. Jiang X, Tan M, Xia M, Huang P, Kennedy MA. Intra-species sialic acid polymorphism in humans: a common niche for influenza and coronavirus pandemics? *Emerg Microbes Infect*. 2021;10(1):1191-1199. doi:10.1080/22221751.2021.1935329
275. Dhar C, Sasmal A, Diaz S, et al. Are sialic acids involved in COVID-19 pathogenesis? *Glycobiology*. 2021;31(9):1068-1071. doi:10.1093/glycob/cwab063
276. Unione L, Moure MJ, Lenza MP, et al. The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Directly Binds Exogenous Sialic Acids: A NMR View. *Angew Chem*. 2022;134(18):e202201432. doi:10.1002/ange.202201432
277. Frąc M, Hannula SE, Bełka M, Jędryczka M. Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. *Front Microbiol*. 2018;9. doi:https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707
278. Belvonicikova P, Splichalova P, Videnska P, Gardlik R. The Human Mycobiome: Colonization, Composition and the Role in Health and Disease. *J Fungi*. 2022;8(10). doi:10.3390/jof8101046
279. Köhler JR, Casadevall A, Perfect J. The Spectrum of Fungi That Infects Humans. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(1). doi:10.1101/cshperspect.a019273
280. Rodrigues ML, Dobroff ASS, Couceiro JN dos SS, Alviano CS, Schauer R, Travassos LR. Sialylglycoconjugates and sialyltransferase activity in the fungus *Cryptococcus neoformans*. *Glycoconj J*. 2002;19(3):165-173. doi:10.1023/A:1024245606607
281. Bose Indrani, Reese Amy J., Ory Jeramia J., Janbon Guilhem, Doering Tamara L. A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2003;2(4):655-663. doi:10.1128/EC.2.4.655-663.2003
282. Warwas ML, Watson JN, Bennet AJ, Moore MM. Structure and role of sialic acids on the surface of *Aspergillus fumigatus* conidiospores. *Glycobiology*. 2007;17(4):401-410. doi:10.1093/glycob/cwl085

283. Alviano CS, Travassos LR, Schauer R. Sialic acids in fungi. *Glycoconj J*. 1999;16:545-554.
284. Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(1):179-206. doi:10.1016/j.idc.2015.10.006
285. Horwath MC, Fecher RA, Deepe GS. Histoplasma capsulatum, lung infection and immunity. *Future Microbiol*. 2015;10:967-975. doi:10.2217/fmb.15.25
286. Sil A, Andrianopoulos A. Thermally Dimorphic Human Fungal Pathogens—Polyphyletic Pathogens with a Convergent Pathogenicity Trait. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(8):a019794. doi:10.1101/cshperspect.a019794
287. Valdez AF, Miranda DZ, Guimarães AJ, Nimrichter L, Nosanchuk JD. Pathogenicity & virulence of Histoplasma capsulatum - A multifaceted organism adapted to intracellular environments. *Virulence*. 2022;13(1):1900. doi:10.1080/21505594.2022.2137987
288. Mittal J, Ponce MG, Gendlina I, Nosanchuk JD. Histoplasma Capsulatum: Mechanisms for Pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2019;422:157-191. doi:10.1007/82_2018_114
289. Horwath MC, Fecher RA, Deepe GS. Histoplasma capsulatum, lung infection and immunity. *Future Microbiol*. 2015;10:967-975. doi:10.2217/fmb.15.25
290. Burgess TB, Condliffe AM, Elks PM. A Fun-Guide to Innate Immune Responses to Fungal Infections. *J Fungi*. 2022;8(8):8. doi:10.3390/jof8080805
291. Erwig LP, Gow NAR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(3):163-176. doi:10.1038/nrmicro.2015.21
292. Guimaraes AJ, de Cerqueira MD, Nosanchuk JD. Surface Architecture of Histoplasma Capsulatum. *Front Microbiol*. 2011;2. doi:10.3389/fmicb.2011.00225
293. Uribe-Querol E, Rosales C. Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. *Front Immunol*. 2017;8:1368. doi:10.3389/fimmu.2017.01368
294. Huang S, Deepe Jr. GS. Notch regulates Histoplasma capsulatum clearance in mouse lungs during innate and adaptive immune response phases in primary infection. *J Leukoc Biol*. 2022;112(5):1137-1154. doi:10.1002/JLB.4A1221-743R
295. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, et al. Candida albicans—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J Fungi*. 2021;7(2):79. doi:10.3390/jof7020079
296. Sonesson A, Bartosik J, Christiansen J, et al. Sensitization to skin-associated microorganisms in adult patients with atopic dermatitis is of importance for disease severity. *Acta Derm Venereol*. 2013;93(3):340-345. doi:10.2340/00015555-1465
297. Kobiela A, Frackowiak JE, Biernacka A, et al. Exposure of Keratinocytes to Candida Albicans in the Context of Atopic Milieu Induces Changes in the Surface Glycosylation

- Pattern of Small Extracellular Vesicles to Enhance Their Propensity to Interact With Inhibitory Siglec Receptors. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.884530
298. Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegraki A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. *Clin Interv Aging.* 2013;8:1199-1208. doi:10.2147/CIA.S39120
 299. R AN, Rafiq NB. Candidiasis. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2025. Accessed January 23, 2025. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560624/>
 300. Valentijn-Benz M, Nazmi K, Brand HS, van't Hof W, Veerman ECI. Growth of *Candida albicans* in human saliva is supported by low-molecular-mass compounds. *FEMS Yeast Res.* 2015;15(8):fov088. doi:10.1093/femsyr/fov088
 301. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence.* 2022;13(1):89-121. doi:10.1080/21505594.2021.2019950
 302. Masuoka J. Surface Glycans of *Candida albicans* and Other Pathogenic Fungi: Physiological Roles, Clinical Uses, and Experimental Challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(2):281-310. doi:10.1128/CMR.17.2.281-310.2004
 303. Soares RMA, de A. Soares RM, Alviano DS, Angluster J, Alviano CS, Travassos LR. Identification of sialic acids on the cell surface of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2000;1474(2):262-268. doi:10.1016/S0304-4165(00)00003-9
 304. Alviano CS, Travassos LR, Schauer R. Sialic acids in fungi. *Glycoconj J.* 1999;16(9):545-554. doi:10.1023/A:1007078106280
 305. Roggentin P, Krug G, Schauer R, Brasch J. Lack of sialidase activity in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses.* 1999;42(1-2):33-36. doi:10.1046/j.1439-0507.1999.00407.x
 306. Theel Elitza S., Pritt Bobbi S. Parasites. *Microbiol Spectr.* 2016;4(4). doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0013-2015
 307. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol.* 2015;16(4):343-353. doi:10.1038/ni.3123
 308. Coakley G, Buck AH, Maizels RM. Host parasite communications—Messages from helminths for the immune system: Parasite communication and cell-cell interactions. *Sens Signal Parasit.* 2016;208(1):33-40. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.06.003
 309. Agusti R, Gallo-Rodriguez C, de Lederkremer RM. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. A tool for the synthesis of sialylated oligosaccharides. *Carbohydr Res.* 2019;479:48-58. doi:10.1016/j.carres.2019.05.004

310. Schmid-Hempel P. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2008;364(1513):85-98. doi:10.1098/rstb.2008.0157
311. Useche Y, Pérez AR, de Meis J, Bonomo A, Savino W. Central nervous system commitment in Chagas disease. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.975106
312. da Silva Oliveira Barbosa E, Roggero EA, González FB, et al. Evidence in Favor of an Alternative Glucocorticoid Synthesis Pathway During Acute Experimental Chagas Disease. *Front Endocrinol.* 2020;10. doi:https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00866
313. González FB, Savino W, Pérez AR. Brain-Thymus Connections in Chagas Disease. *Neuroimmunomodulation.* 2024;31(1):78-88. doi:10.1159/000538220
314. Cardoso MS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front Immunol.* 2016;6. doi:https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659
315. Savino W, Villa-Verde DMS, Mendes-da-Cruz DA, et al. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokines Coming Age S Am.* 2007;18(1):107-124. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.01.010
316. Flávia Nardy A, Freire-de-Lima CG, Morrot A. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. Kul O, ed. *J Immunol Res.* 2015;2015:178947. doi:10.1155/2015/178947
317. Muiá R, Yu H, Prescher J, Hellman U, Bertozzi C, Campetella O. Identification of glycoproteins targeted by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, a virulence factor that disturbs lymphocyte glycosylation. *Glycobiology.* 2010;20:833-842. doi:10.1093/glycob/cwq037
318. Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J.* 2008;410(2):359-368. doi:10.1042/bj20071138
319. Martín-Escolano J, Marín C, Rosales MJ, Tsaousis AD, Medina-Carmona E, Martín-Escolano R. An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. *ACS Infect Dis.* 2022;8(6):1107-1115. doi:10.1021/acsinfecdis.2c00123
320. Schacht P, Arcieri G, Hullmann R. Safety of oral ciprofloxacin: An update based on clinical trial results. *Am J Med.* 1989;87(5, Supplement 1):S98-S102. doi:10.1016/0002-9343(89)90033-8
321. Adasme MF, Bolz SN, Adelmann L, et al. Repositioned Drugs for Chagas Disease Unveiled via Structure-Based Drug Repositioning. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):22. doi:10.3390/ijms21228809

322. Goerdeler F, Seeberger PH, Moscovitz O. Unveiling the Sugary Secrets of Plasmodium Parasites. *Front Microbiol.* 2021;12:712538. doi:10.3389/fmicb.2021.712538
323. Fact sheet about malaria. 2024. Accessed January 28, 2025. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
324. Hanboonkunupakarn B, White NJ. The threat of antimalarial drug resistance. *Trop Dis Travel Med Vaccines.* 2016;2(1):1. doi:10.1186/s40794-016-0027-8
325. Rasmussen C, Alonso P, Ringwald P. Current and emerging strategies to combat antimalarial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2022;20(3):353-372. doi:10.1080/14787210.2021.1962291
326. Chuang YM, Agunbiade TA, Tang XD, Freudzon M, Almeras L, Fikrig E. The Effects of A Mosquito Salivary Protein on Sporozoite Traversal of Host Cells. *J Infect Dis.* 2020;224(3):544-553. doi:10.1093/infdis/jiaa759
327. Suwanarusk R, Cooke BM, Dondorp AM, et al. The deformability of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum and P. vivax. *J Infect Dis.* 2004;189(2):190-194. doi:10.1086/380468
328. Valenciano AL, Gomez-Lorenzo MG, Vega-Rodríguez J, Adams JH, Roth A. In vitro models for human malaria: targeting the liver stage. *Trends Parasitol.* 2022;38(9):758-774. doi:10.1016/j.pt.2022.05.014
329. Deroost K, Pham TT, Opdenakker G, Van den Steen PE. The immunological balance between host and parasite in malaria. *FEMS Microbiol Rev.* 2016;40(2):208-257. doi:10.1093/femsre/fuv046
330. Goldberg DE, Zimmerberg J. Hardly Vacuuous: the Parasitophorous Vacuolar Membrane of Malaria Parasites. *Trends Parasitol.* 2020;36(2):138-146. doi:10.1016/j.pt.2019.11.006
331. Molina-Franky J, Patarroyo ME, Kalkum M, Patarroyo MA. The Cellular and Molecular Interaction Between Erythrocytes and Plasmodium falciparum Merozoites. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:816574. doi:10.3389/fcimb.2022.816574
332. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell.* 2006;124(4):755-766. doi:10.1016/j.cell.2006.02.006
333. Ezema CA, Okagu IU, Ezeorba TPC. Escaping the enemy's bullets: an update on how malaria parasites evade host immune response. *Parasitol Res.* 2023;122(8):1715-1731. doi:10.1007/s00436-023-07868-6
334. Venugopal K, Hentzschel F, Valkiūnas G, Marti M. Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(3):177-189. doi:10.1038/s41579-019-0306-2

335. Butcher GA, Mitchell GH, Cohen S. Mechanism of Host Specificity in Malarial Infection. *Nature*. 1973;244(5410):40-42. doi:10.1038/244040a0
336. Habtamu K, Petros B, Yan G. Plasmodium vivax: the potential obstacles it presents to malaria elimination and eradication. *Trop Dis Travel Med Vaccines*. 2022;8(1):27. doi:10.1186/s40794-022-00185-3
337. Jaskiewicz E, Jodłowska M, Kaczmarek R, Zerka A. Erythrocyte glycophorins as receptors for Plasmodium merozoites. *Parasit Vectors*. 2019;12(1):317. doi:10.1186/s13071-019-3575-8
338. Alves-Rosa MF, Tayler NM, Dorta D, Coronado LM, Spadafora C. P. falciparum Invasion and Erythrocyte Aging. *Cells*. 2024;13(4):4. doi:10.3390/cells13040334
339. Moskovitz R, Pholcharee T, DonVito SM, et al. Structural basis for DARC binding in reticulocyte invasion by Plasmodium vivax. *Nat Commun*. 2023;14(1):3637. doi:10.1038/s41467-023-39357-w
340. Day CJ, Favuzza P, Bielfeld S, et al. The essential malaria protein PfCyRPA targets glycans to invade erythrocytes. *Cell Rep*. 2024;43(4):114012. doi:10.1016/j.celrep.2024.114012
341. Yang PK, Liang XY, Lin M, et al. Population genetic analysis of the Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen-175 (EBA-175) gene in Equatorial Guinea. *Malar J*. 2021;20(1):374. doi:10.1186/s12936-021-03904-x
342. Jiang L, Gaur D, Mu J, Zhou H, Long CA, Miller LH. Evidence for erythrocyte-binding antigen 175 as a component of a ligand-blocking blood-stage malaria vaccine. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(18):7553-7558. doi:10.1073/pnas.1104050108
343. Takashima E, Otsuki H, Morita M, et al. The Need for Novel Asexual Blood-Stage Malaria Vaccine Candidates for Plasmodium falciparum. *Biomolecules*. 2024;14(1):100. doi:10.3390/biom14010100
344. Kim HJ, Schweiker S, Powell K, Levonis S. An efficient and robust HPLC method to determine the sialylation levels of human epithelial cells. *PLoS ONE*. 2022;17(1):e0257178. doi:10.1371/journal.pone.0257178
345. Szabo Z, Bones J, Guttman A, Glick J, Karger BL. Sialic acid speciation using capillary electrophoresis: optimization of analyte derivatization and separation. *Anal Chem*. 2012;84(18):7638-7642. doi:10.1021/ac301840f
346. Tang S, Li L, Wang R, et al. A Schematic Colorimetric Assay for Sialic Acid Assay Based on PEG-Mediated Interparticle Crosslinking Aggregation of Gold Nanoparticles. *Biosensors*. 2023;13(2):2. doi:10.3390/bios13020164
347. S. Costa JB, de Paula NTG, da Silva PAB, de Souza GCS, Paim APS, Lavorante AF. A spectrophotometric procedure for sialic acid determination in milk employing a flow-batch

- analysis system with direct heating. *Microchem J.* 2019;147:782-788. doi:10.1016/j.microc.2019.03.086
348. Wang MH, Wang ZF, Yuan M, Yang CG, Wang DL, Wang SQ. Changes in the Serum and Tissue Levels of Free and Conjugated Sialic Acids, Neu5Ac, Neu5Gc, and KDN in Mice after the Oral Administration of Edible Bird's Nests: An LC–MS/MS Quantitative Analysis. *Separations.* 2024;11(4):4. doi:10.3390/separations11040107
 349. Ye L, Mu L, Li G, Bao Y. Assessing sialic acid content in food by hydrophilic chromatography-high performance liquid chromatography. *J Food Compos Anal.* 2020;87:103393. doi:10.1016/j.jfca.2019.103393
 350. Wang L, Wang D, Zhou X, Wu L, Sun XL. Systematic investigation of quinoxaline derivatization of sialic acids and their quantitation applicability using high performance liquid chromatography. *RSC Adv.* 2014;4(86):45797-45803. doi:10.1039/C4RA08930H
 351. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: A Robust Method for Quantitation of Fluorescently Labeled and Derivatized Sialic Acids Isolated from Mouse Liver. Accessed January 27, 2025. [https://app.jove.com/v/\[...slug\]](https://app.jove.com/v/[...slug])
 352. Kim HJ, Schweiker S, Powell K, Levonis S. An efficient and robust HPLC method to determine the sialylation levels of human epithelial cells. *PLoS ONE.* 2022;17(1):e0257178. doi:10.1371/journal.pone.0257178
 353. Palmisano G, Larsen MR, Packer NH, Thaysen-Andersen M. Structural analysis of glycoprotein sialylation-part II: LC-MS based detection. *RSC Adv.* 2013;3(45):22706-22726. doi:10.1039/c3ra42969e
 354. Wang F, Xie B, Wang B, Troy FA. LC-MS/MS glycomic analyses of free and conjugated forms of the sialic acids, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in human throat cancers. *Glycobiology.* 2015;25(12):1362-1374. doi:10.1093/glycob/cwv051
 355. van der Ham M, Prinsen BHCMT, Huijman JGM, et al. Quantification of free and total sialic acid excretion by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;848(2):251-257. doi:10.1016/j.jchromb.2006.10.066
 356. Zhou S, Dong X, Veillon L, Huang Y, Mechref Y. LC-MS/MS analysis of permethylated N-glycans facilitating isomeric characterization. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409(2):453-466. doi:10.1007/s00216-016-9996-8
 357. Guerrero-Flores GN, Pacheco FJ, Boskovic DS, et al. Sialic acids Neu5Ac and KDN in adipose tissue samples from individuals following habitual vegetarian or non-vegetarian dietary patterns. *Sci Rep.* 2023;13(1):12593. doi:10.1038/s41598-023-38102-z
 358. Ho C, Lam C, Chan M, et al. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev.* 2003;24(1):3-12.

359. Mellon FA. MASS SPECTROMETRY | Principles and Instrumentation. In: Caballero B, ed. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Academic Press; 2003:3739-3749. doi:10.1016/B0-12-227055-X/00746-X
360. Kaklamanos G, Aprea E, Theodoridis G. 11 - Mass spectrometry: principles and instrumentation. In: Pico Y, ed. *Chemical Analysis of Food (Second Edition)*. Academic Press; 2020:525-552. doi:10.1016/B978-0-12-813266-1.00011-5
361. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem*. 2012;2012:282574. doi:10.1155/2012/282574
362. Thomas SN, French D, Jannetto PJ, Rappold BA, Clarke WA. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nat Rev Methods Primer*. 2022;2(1):1-14. doi:10.1038/s43586-022-00175-x
363. Bhardwaj C, Hanley L. Ion sources for mass spectrometric identification and imaging of molecular species. *Nat Prod Rep*. 2014;31(6):756-767. doi:10.1039/c3np70094a
364. Malik AK, Kumar R, Heena. Spectroscopy: Types. In: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, eds. *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press; 2016:64-72. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00643-7
365. Ravelli MN, Shriver TC, Schoeller DA. Doubly labeled water. In: Caballero B, ed. *Encyclopedia of Human Nutrition (Fourth Edition)*. Academic Press; 2023:52-61. doi:10.1016/B978-0-12-821848-8.00031-7
366. Nishikaze T. Sialic acid derivatization for glycan analysis by mass spectrometry. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2019;95(9):523-537. doi:10.2183/pjab.95.036
367. Priego-Capote F, Orozco-Solano MI, Calderón-Santiago M, Luque de Castro MD. Quantitative determination and confirmatory analysis of N-acetylneuraminic and N-glycolylneuraminic acids in serum and urine by solid-phase extraction on-line coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2014;1346:88-96. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.051
368. Estrada-Martínez LE, Moreno-Celis U, Cervantes-Jiménez R, Ferriz-Martínez RA, Blanco-Labra A, García-Gasca T. Plant lectins as medical tools against digestive system cancers. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7). doi:10.3390/ijms18071403
369. Serdar Z, Yeşilbursa D, Dirican M, Sarandöl E, Serdar A. Sialic acid and oxidizability of lipid and proteins and antioxidant status in patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct*. 2007;25(6):655-664. doi:10.1002/cbf.1369
370. Volkhina IV, Butolin EG. Clinical and Diagnostic Significance of Sialic Acids Determination in Biological Material. *Biochem Mosc Suppl Ser B Biomed Chem*. 2022;16(3):165-174. doi:10.1134/S199075082203012X

371. Roth GA, Mensah GA, Fuster V. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks: A Compass for Global Action. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(25):2980-2981. doi:10.1016/j.jacc.2020.11.021
372. Teo KK, Rafiq T. Cardiovascular Risk Factors and Prevention: A Perspective From Developing Countries. *Can J Cardiol*. 2021;37(5):733-743. doi:10.1016/j.cjca.2021.02.009
373. Cocciolone AJ, Hawes JZ, Staiculescu MC, Johnson EO, Murshed M, Wagenseil JE. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2018;315(2):H189-H205. doi:10.1152/ajpheart.00087.2018
374. Milusev A, Rieben R, Sorvillo N. The Endothelial Glycocalyx: A Possible Therapeutic Target in Cardiovascular Disorders. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:897087. doi:10.3389/fcvm.2022.897087
375. D'Addio M, Frey J, Otto VI. The manifold roles of sialic acid for the biological functions of endothelial glycoproteins. *Glycobiology*. 2020;30(8):490-499. doi:10.1093/glycob/cwaa008
376. Cheeseman J, Badia C, Elgood-Hunt G, et al. Elevated concentrations of Neu5Ac and Neu5,9Ac2 in human plasma: potential biomarkers of cardiovascular disease. *Glycoconj J*. 2023;40(6):645-654. doi:10.1007/s10719-023-10138-3
377. Gokmen SS, Kilicli G, Ozcelik F, Ture M, Gulen S. Association between serum total and lipid-bound sialic acid concentration and the severity of coronary atherosclerosis. *J Lab Clin Med*. 2002;140(2):110-118. doi:10.1067/mlc.2002.126344
378. Mezentsev A, Bezsonov E, Kashirskikh D, Baig MS, Eid AH, Orekhov A. Proatherogenic Sialidases and Desialylated Lipoproteins: 35 Years of Research and Current State from Bench to Bedside. *Biomedicines*. 2021;9(6):600. doi:10.3390/biomedicines9060600
379. Kawanishi K, Coker JK, Grunddal KV, et al. Dietary Neu5Ac Intervention Protects Against Atherosclerosis Associated With Human-Like Neu5Gc Loss—Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(11):2730-2739. doi:10.1161/ATVBAHA.120.315280
380. Pham T, Gregg CJ, Karp F, et al. Evidence for a novel human-specific xeno-auto-antibody response against vascular endothelium. *Blood*. 2009;114(25):5225-5235. doi:10.1182/blood-2009-05-220400
381. Yida Z, Imam MU, Ismail M, et al. N-Acetylneuraminic acid attenuates hypercoagulation on high fat diet-induced hyperlipidemic rats. *Food Nutr Res*. 2015;59(1):29046. doi:10.3402/fnr.v59.29046
382. Peng J, Vongpatanasin W, Sacharidou A, et al. Supplementation With the Sialic Acid Precursor N-Acetyl-D-Mannosamine Breaks the Link Between Obesity and Hypertension. *Circulation*. 2019;140(24):2005-2018. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043490
383. Orlich MJ, Singh PN, Sabaté J, et al. Vegetarian Dietary Patterns and the Risk of Colorectal Cancers. *JAMA Intern Med*. 2015;175(5):767-776. doi:10.1001/jamainternmed.2015.59

384. Matar P, Alaniz L, Rozados V, et al. Immunotherapy for liver tumors: present status and future prospects. *J Biomed Sci.* 2009;16(1):30. doi:10.1186/1423-0127-16-30
385. Varki A. Letter to the Glyco-Forum: Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but pathogens can mimic them. *Glycobiology.* 2011;21(9):1121-1124. doi:10.1093/glycob/cwr087
386. Lübbers J, Rodríguez E, van Kooyk Y. Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. *Front Immunol.* 2018;9(December):2807-2807. doi:10.3389/fimmu.2018.02807
387. Pilling D, Karhadkar TR, Gomer RH. High-Fat Diet–Induced Adipose Tissue and Liver Inflammation and Steatosis in Mice Are Reduced by Inhibiting Sialidases. *Am J Pathol.* 2021;191(1):131-143. doi:10.1016/j.ajpath.2020.09.011
388. Nayak B S, Bhaktha G. Relationship between Sialic acid and metabolic variables in Indian type 2 diabetic patients. *Lipids Health Dis.* 2005;4(1):15. doi:10.1186/1476-511X-4-15
389. Yida Z, Imam MU, Ismail M, et al. N-Acetylneuraminic Acid Supplementation Prevents High Fat Diet-Induced Insulin Resistance in Rats through Transcriptional and Nontranscriptional Mechanisms. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1-10. doi:10.1155/2015/602313
390. White EJ, Gyulay G, Lhoták Š, et al. Sialidase down-regulation reduces non-HDL cholesterol, inhibits leukocyte transmigration, and attenuates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *J Biol Chem.* 2018;293(38):14689-14706. doi:10.1074/jbc.RA118.004589
391. Munkley J, Scott E. Targeting Aberrant Sialylation to Treat Cancer. *Medicines.* 2019;6(4):102-102. doi:10.3390/medicines6040102
392. Rabinovich GA, Croci DO. Regulatory Circuits Mediated by Lectin-Glycan Interactions in Autoimmunity and Cancer. *Immunity.* 2012;36(3):322-335. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.004
393. Rodrigues E, Macauley MS. Hypersialylation in cancer: Modulation of inflammation and therapeutic opportunities. *Cancers.* 2018;10(6):1-19. doi:10.3390/cancers10060207
394. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
395. Croci DO, Zacarias Fluck MF, Rico MJ, Matar P, Rabinovich GA, Scharovsky OG. Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(11):1687-1700. doi:10.1007/s00262-007-0343-y

396. Cagnoni AJ, Pérez Sáez JM, Rabinovich GA, Mariño KV. Turning-Off Signaling by Siglecs, Selectins, and Galectins: Chemical Inhibition of Glycan-Dependent Interactions in Cancer. *Front Oncol.* 2016;6. doi:<https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00109>
397. van de Wall S, Santegoets KCM, van Houtum EJH, Büll C, Adema GJ. Sialoglycans and Siglecs Can Shape the Tumor Immune Microenvironment. *Trends Immunol.* 2020;41(4):274-285. doi:10.1016/j.it.2020.02.001
398. Büll C, den Brok MH, Adema GJ. Sweet escape: Sialic acids in tumor immune evasion. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 2014;1846(1):238-246. doi:10.1016/j.bbcan.2014.07.005
399. Dall'Olio F, Malagolini N, Trinchera M, Chiricolo M. Sialosignaling: Sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2014;1840(9):2752-2764. doi:10.1016/j.bbagen.2014.06.006
400. Sun J, Lu Q, Sanmamed MF, Wang J. Siglec-15 as an Emerging Target for Next-generation Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2021;27(3):680-688. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-2925
401. Altevogt P, Sammar M, Hüser L, Kristiansen G. Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer. *Int J Cancer.* 2021;148(3):546-559. doi:10.1002/ijc.33249
402. Stanczak MA, Rodrigues Mantuano N, Kirchhammer N, et al. Targeting cancer glycosylation repolarizes tumor-associated macrophages allowing effective immune checkpoint blockade. *Sci Transl Med.* 2022;14(669):eabj1270. doi:10.1126/scitranslmed.abj1270
403. Diamantopoulou S, Stagiannis KD, Vasilopoulos K, Barlas P, Tseggenidis T, Karamanos NK. Importance of high-performance liquid chromatographic analysis of serum N-acetylneuraminic acids in evaluating surgical treatment in patients with early endometrial cancer. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 1999;732(2):375-381. doi:10.1016/S0378-4347(99)00304-7
404. Phitak T, Klangjorhor J, Pothacharoen P, Pruksakorn D, Kongtawelert P. Level and distribution of secreted and cell-associated N-acetyl, N-glycolylneuraminic, and deaminoneuraminic acids in osteosarcoma cells isolated from patients. *ScienceAsia.* 2017;43(1):15-25. doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2017.43.015
405. Yabu M, Korekane H, Hatano K, et al. Occurrence of free deaminoneuraminic acid (KDN)-containing complex-type N-glycans in human prostate cancers. *Glycobiology.* 2013;23(6):634-642. doi:10.1093/glycob/cws132
406. Tzanakakis GN, Syrokou A, Kanakis I, Karamanos NK. Determination and distribution of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids in culture media and cell associated glycoconjugates from human malignant mesothelioma and adenocarcinoma cells. *Biomed Chromatogr.* 2006;20(5):434-439. doi:10.1002/bmc.573

407. G. N. Tzanakakis DN P Katonis, Karamanos IK and NKK. Expression and distribution of N-acetyl and N-glycolylneuraminic acids in secreted and cell-associated glycoconjugates by two human osteosarcoma cell lines. *Biomed Chromatogr.* 2007;21:406-409. doi:10.1002/bmc
408. Dobie C, Skropeta D. Insights into the role of sialylation in cancer progression and metastasis. *Br J Cancer.* 2021;124(1):76-90. doi:10.1038/s41416-020-01126-7
409. Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Genet Cell Mech Oncog.* 2008;18(1):11-18. doi:10.1016/j.gde.2007.12.007
410. Smith BAH, Bertozzi CR. The clinical impact of glycobiology: targeting selectins, Siglecs and mammalian glycans. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(3):217-243. doi:10.1038/s41573-020-00093-1
411. Duan S, Paulson JC. Siglecs as Immune Cell Checkpoints in Disease. *Annu Rev Immunol.* 2020;38(1):365-395. doi:10.1146/annurev-immunol-102419-035900
412. Läubli H, Borsig L. Altered Cell Adhesion and Glycosylation Promote Cancer Immune Suppression and Metastasis. *Front Immunol.* 2019;10. doi:https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02120
413. Anselmino LE, Baglioni MV, Malizia F, et al. Repositioning metformin and propranolol for colorectal and triple negative breast cancers treatment. *Sci Rep.* 2021;11(1):8091. doi:10.1038/s41598-021-87525-z
414. Veettil SK, Wong TY, Loo YS, et al. Role of Diet in Colorectal Cancer Incidence: Umbrella Review of Meta-analyses of Prospective Observational Studies. *JAMA Netw Open.* 2021;4(2):e2037341-e2037341. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.37341
415. Buja A, Pierbon M, Lago L, Grotto G, Baldo V. Breast Cancer Primary Prevention and Diet: An Umbrella Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(13). doi:10.3390/ijerph17134731
416. Debras C, Chazelas E, Srouf B, et al. Total and added sugar intakes, sugar types, and cancer risk: results from the prospective NutriNet-Santé cohort. *Am J Clin Nutr.* 2020;112(5):1267-1279. doi:10.1093/ajcn/nqaa246
417. Gaesser GA. Whole Grains, Refined Grains, and Cancer Risk: A Systematic Review of Meta-Analyses of Observational Studies. *Nutrients.* 2020;12(12). doi:10.3390/nu12123756
418. Orlich MJ, Mashchak AD, Jaceldo-Siegl K, et al. Dairy foods, calcium intakes, and risk of incident prostate cancer in Adventist Health Study–2. *Am J Clin Nutr.* 2022;116(2):314-324. doi:10.1093/ajcn/nqac093
419. Penniecook-Sawyers JA, Jaceldo-Siegl K, Fan J, et al. Vegetarian dietary patterns and the risk of breast cancer in a low-risk population. *Br J Nutr.* 2016;115(10):1790-1797. doi:10.1017/S0007114516000751

420. Vargas AJ, Thompson PA. Diet and Nutrient Factors in Colorectal Cancer Risk. *Nutr Clin Pract.* 2012;27(5):613-623. doi:10.1177/0884533612454885
421. Aykan NF. Red meat and colorectal cancer. *Oncol Rev.* 2015;9(1):38-44. doi:10.4081/oncol.2015.288
422. Oostindjer M, Alexander J, Amdam GV, et al. The role of red and processed meat in colorectal cancer development: A perspective. *Meat Sci.* 2014;97(4):583-596. doi:10.1016/j.meatsci.2014.02.011
423. Sesink ALA, Termont DSML, Kleibeuker JH, Meer RVD. Red meat and colon cancer: dietary haem, but not fat, has cytotoxic and hyperproliferative effects on rat colonic epithelium Aloys. *Carcinogenesis.* 2000;21(10):1909-1915.
424. Turner ND, Lloyd SK. Association between red meat consumption and colon cancer: A systematic review of experimental results. *Exp Biol Med.* 2017;242(8):813-839. doi:10.1177/1535370217693117
425. Schrenk D, Bignami M, Bodin L, et al. Risk assessment of N-nitrosamines in food. *EFSA J.* 2023;21(3):e07884. doi:10.2903/j.efsa.2023.7884
426. Wu B, Yang D, Yang S, Zhang G. Dietary Salt Intake and Gastric Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Nutr.* 2021;8:801228. doi:10.3389/fnut.2021.801228
427. Fiorito V, Chiabrando D, Petrillo S, Bertino F, Tolosano E. The Multifaceted Role of Heme in Cancer. *Front Oncol.* 2020;9. doi:10.3389/fonc.2019.01540
428. Alisson-silva F, Kawanishi K, Varki A. Human risk of diseases associated with red meat intake: Analysis of current theories and proposed role for metabolic incorporation of a non-human sialic acid. *Mol Asp Med Asp Med.* 2016;(51):16-30. doi:10.1016/j.mam.2016.07.002.Human
429. zur Hausen H. Red meat consumption and cancer: Reasons to suspect involvement of bovine infectious factors in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2012;130(11):2475-2483. doi:10.1002/ijc.27413
430. Crisà A, Marchitelli C, Failla S, Contò M. Determination of N-acetylneuraminic and N-glycolylneuraminic acids in unprocessed milk of four cattle breeds. *J Dairy Res.* 2022;89(3):299-301. doi:10.1017/S0022029922000620
431. Hinterseher J, Günther J, Zlatina K, et al. Milk Polysialic Acid Levels Rapidly Decrease in Line with the N-Acetylneuraminic Acid Concentrations during Early Lactation in Dairy Cows. *Biology.* 2022;12(1):5. doi:10.3390/biology12010005
432. Frei R, Roduit C, Ferstl R, Mahony LO, Lauener RP. Exposure of children to rural lifestyle factors associated With protection against allergies induces an Anti-Neu5Gc antibody response. *Front Immunol.* 2019;10(July):4-8. doi:10.3389/fimmu.2019.01628

433. Leviatan Ben-Arye S, Schneider C, Yu H, et al. Differential recognition of diet-derived Neu5Gc-Neoantigens on glycan microarrays by carbohydrate-specific pooled human IgG and IgA antibodies. *Bioconjug Chem*. 2019;30(5):1565-1574. doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00273
434. He E, Quan W, Luo J, Liu C, Zheng W, Shen Q. Absorption and Transport Mechanism of Red Meat-Derived N-glycolylneuraminic Acid and Its Damage to Intestinal Barrier Function through the NF- κ B Signaling Pathway. *Toxins*. 2023;15(2):132. doi:10.3390/toxins15020132
435. Salama A, Evanno G, Lim N, et al. Anti-Gal and anti-Neu5Gc responses in nonimmunosuppressed patients following treatment with rabbit anti-thymocyte polyclonal IgGs. *Transplantation*. 2017;101(10):2501-2507. doi:10.1097/TP.0000000000001686
436. Soullillou JP, Süsal C, Döhler B, Opelz G. No increase in colon cancer risk following induction with Neu5Gc-bearing rabbit anti-T cell IgG (ATG) in recipients of kidney transplants. *Cancers*. 2018;10(9):11-13. doi:10.3390/cancers10090324
437. Miroshnychenko A, Zeraatkar D, Phillips MR, et al. Cohort studies investigating the effects of exposures: key principles that impact the credibility of the results. *Eye*. 2022;36(5):905-906. doi:10.1038/s41433-021-01897-0
438. Wang X, Kattan MW. Cohort Studies: Design, Analysis, and Reporting. *CHEST*. 2020;158(1):S72-S78. doi:10.1016/j.chest.2020.03.014
439. Hernández V. Estudios epidemiológicos: tipos, diseño e interpretación. *Enferm Inflammatoria Intest Al Día*. 2017;16(3):98-105. doi:10.1016/j.eii.2017.03.001
440. Euser AM, Zoccali C, Jager KJ, Dekker FW. Cohort studies: prospective versus retrospective. *Nephron Clin Pract*. 2009;113(3):c214-217. doi:10.1159/000235241
441. Orlich MJ, Singh PN, Sabaté J, et al. Vegetarian Dietary Patterns and Mortality in Adventist Health Study 2. *JAMA Intern Med*. 2013;173(13):1230. doi:10.1001/jamainternmed.2013.6473
442. Jaceldo-Siegl K, Knutsen SF, Sabaté J, et al. Validation of nutrient intake using an FFQ and repeated 24 h recalls in black and white subjects of the Adventist Health Study-2 (AHS-2). *Public Health Nutr*. 2010;13(06):812-819. doi:10.1017/S1368980009992072
443. Orlich MJ, Jaceldo-Siegl K, Sabaté J, Fan J, Singh PN, Fraser GE. Patterns of food consumption among vegetarians and non-vegetarians. *Br J Nutr*. 2014;112(10):1644-1653. doi:10.1017/S000711451400261X
444. Orlich MJ, Fraser GE. Vegetarian diets in the Adventist Health Study 2: a review of initial published findings. *Am J Clin Nutr*. 2014;100 Suppl 1(1):353S-8S. doi:10.3945/ajcn.113.071233

445. Tong TYN, Appleby PN, Bradbury KE, et al. Risks of ischaemic heart disease and stroke in meat eaters, fish eaters, and vegetarians over 18 years of follow-up: results from the prospective EPIC-Oxford study. *BMJ*. 2019;366:l4897. doi:10.1136/bmj.l4897
446. Appleby PN, Thorogood M, Mann JI, Key TJ. The Oxford Vegetarian Study: an overview. *Am J Clin Nutr*. 1999;70(3 Suppl):525S-531S. doi:10.1093/ajcn/70.3.525s
447. Key TJ, Papier K, Tong TY. Plant-based diets and long-term health: findings from the EPIC-Oxford study. *Proc Nutr Soc*. 2022;81(2):190-198. doi:10.1017/S0029665121003748
448. Fraser GE. Associations between diet and cancer, ischemic heart disease, and all-cause mortality in non-Hispanic white California Seventh-day Adventists. *Am J Clin Nutr*. 1999;70(3 Suppl):532S-538S. doi:10.1093/ajcn/70.3.532s
449. Matsumoto S, Beeson WL, Shavlik DJ, et al. Association between vegetarian diets and cardiovascular risk factors in non-Hispanic white participants of the Adventist Health Study-2. *J Nutr Sci*. 2019;8:e6. doi:10.1017/jns.2019.1
450. Rizzo NS, Sabaté J, Jaceldo-Siegl K, Fraser GE. Vegetarian Dietary Patterns Are Associated With a Lower Risk of Metabolic Syndrome: The Adventist Health Study 2. *Diabetes Care*. 2011;34(5):1225-1227. doi:10.2337/dc10-1221
451. Pettersen BJ, Anousheh R, Fan J, Jaceldo-Siegl K, Fraser GE. Vegetarian diets and blood pressure among white subjects: results from the Adventist Health Study-2 (AHS-2). *Public Health Nutr*. 2012;15(10):1909-1916. doi:10.1017/S1368980011003454
452. Tantamango-Bartley Y, Jaceldo-Siegl K, Fan J, Fraser G. Vegetarian diets and the incidence of cancer in a low-risk population. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2013;22(2):286-294. doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-1060
453. Lee JW, Morton KR, Walters J, et al. Cohort Profile: The biopsychosocial religion and health study (BRHS). *Int J Epidemiol*. 2009;38(6):1470-1478. doi:10.1093/ije/dyn244
454. Chan J, Knutsen SF, Sabate J, Haddad E, Yan R, Fraser GE. Feasibility of running clinics to collect biological specimens in a nationwide cohort study--Adventist Health Study-2. *Ann Epidemiol*. 2007;17(6):454-457. doi:10.1016/j.annepidem.2006.10.018
455. Halvorsen TG, Reubsæet L, van der Ham M, et al. Quantification of free and total sialic acid excretion by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014;28(2):251-257. doi:10.1016/j.jchromb.2006.10.066
456. Panuwet P, Hunter RE, D'Souza PE, et al. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Crit Rev Anal Chem*. 2016;46(2):93-105. doi:10.1080/10408347.2014.980775

457. Berg T, Strand DH. ¹³C labelled internal standards-A solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples? *J Chromatogr A*. 2011;1218(52):9366-9374. doi:10.1016/j.chroma.2011.10.081
458. Salerno S, Mehrmohamadi M, Liberti MV, et al. RRMix: A method for simultaneous batch effect correction and analysis of metabolomics data in the absence of internal standards. Motta A, ed. *PLOS ONE*. 2017;12(6):e0179530. doi:10.1371/journal.pone.0179530
459. Wang F, Xie B, Wang B, Troy FA. LC-MS/MS glycomic analyses of free and conjugated forms of the sialic acids, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in human throat cancers. *Glycobiology*. 2015;25(12):1362-1374. doi:10.1093/glycob/cwv051
460. Ji S, Wang F, Chen Y, et al. Developmental changes in the level of free and conjugated sialic acids, Neu5Ac, Neu5Gc and KDN in different organs of pig: a LC-MS/MS quantitative analyses. *Glycoconj J*. 2017;34(1):21-30. doi:10.1007/s10719-016-9724-9
461. Mohammadipanah F, Kazemi Shariat Panahi H, Imanparast F, Hamed J. Development of a Reversed-Phase Liquid Chromatographic Assay for the Quantification of Total Persipeptides in Fermentation Broth. *Chromatographia*. 2016;79(19-20):1325-1332. doi:10.1007/s10337-016-3140-y
462. van der Ham M, Prinsen BHCMT, Huijman JGM, et al. Quantification of free and total sialic acid excretion by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;848(2):251-257. doi:10.1016/j.jchromb.2006.10.066
463. Fang M, Xu X, Zhang M, et al. Quantitation of cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid in human leukocytes using LC-MS/MS: method development and validation. *Biomed Chromatogr*. 2020;34(2). doi:10.1002/bmc.4735
464. Shi Y, Xu X, Fang M, et al. Quantitative hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry analysis of N-acetylneuraminic acid and N-acetylmannosamine in human plasma. *J Chromatogr B*. 2015;1000:105-111. doi:10.1016/j.jchromb.2015.07.018
465. Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci*. 2011;2(1):21-21. doi:10.4103/2229-5186.79345
466. Yida Z, Imam MU, Ismail M, Ismail N, Ideris A, Abdullah MA. High fat diet-induced inflammation and oxidative stress are attenuated by N-acetylneuraminic acid in rats. *J Biomed Sci*. 2015;22(1):96. doi:10.1186/s12929-015-0211-6
467. Lindberg G. Resialylation of sialic acid deficit vascular endothelium, circulating cells and macromolecules may counteract the development of atherosclerosis: A hypothesis. *Atherosclerosis*. 2007;192(2):243-245. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.011
468. Doostkam A, Malekmakan L, Hosseinpour A, Janfeshan S, Roozbeh J, Masjedi F. Sialic acid: an attractive biomarker with promising biomedical applications. *Asian Biomed*. 2022;16(4):153-167. doi:10.2478/abm-2022-0020

469. Abolhasani S, Shahbazloo SV, Saadati HM, Mahmoodi N, Khanbabaie N. Evaluation of Serum Levels of Inflammation, Fibrinolysis and Oxidative Stress Markers in Coronary Artery Disease Prediction: A Cross-Sectional Study. *Arq Bras Cardiol*. Published online 2019. doi:10.5935/abc.20190159
470. Christ ER, Cummings MH, Lumb PJ, Crook MA, Sönksen PH, Russell-Jones DL. Growth hormone (GH) replacement therapy reduces serum sialic acid concentrations in adults with GH-deficiency: a double-blind placebo-controlled study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999;51(2):173-179. doi:10.1046/j.1365-2265.1999.00751.x
471. Tseke P, Grapsa E, Stamatelopoulos K, et al. Correlations of Sialic Acid with Markers of Inflammation, Atherosclerosis and Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients. *Blood Purif*. 2008;26(3):261-266. doi:10.1159/000124850
472. Bakri RS, Afzali B, Covic A, et al. Cardiovascular disease in renal allograft recipients is associated with elevated sialic acid or markers of inflammation. *Clin Transplant*. 2004;18(2):201-204. doi:10.1111/j.1399-0012.2004.00156.x
473. Glanz VY, Kashirskikh DA, Grechko AV, Yet SF, Sobenin IA, Orekhov AN. Sialidase Activity in Human Blood Serum Has a Distinct Seasonal Pattern: A Pilot Study. *Biology*. 2020;9(8). doi:10.3390/biology9080184
474. Peng X, Li H, Wang Q, Wang PG, Ji Y. The Emerging Role of Sialic Acids in Obesity and Diabetes: Molecular Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Biomolecules*. 2025;15(11):1522. doi:10.3390/biom15111522
475. Go S, Sato C, Furuhashi K, Kitajima K. Oral ingestion of mannose alters the expression level of deaminoneuraminic acid (KDN) in mouse organs. *Glycoconj J*. 2006;23(5-6):411-421. doi:10.1007/s10719-006-6734-z
476. Perdicchio M, Ilarregui JM, Verstege MI, et al. Sialic acid-modified antigens impose tolerance via inhibition of T-cell proliferation and de novo induction of regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(12):3329-3334. doi:10.1073/pnas.1507706113
477. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. *Arch Med Sci*. 2013;9(2):191-200. doi:10.5114/aoms.2013.33181
478. Ouchi N. Adipocytokines in cardiovascular and metabolic diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23(6):645-654. doi:10.5551/jat.34918
479. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(8):327-332. doi:10.1016/S1043-2760(00)00301-5
480. Zamboni M, Nori N, Brunelli A, Zoico E. How does adipose tissue contribute to inflammaging? *Exp Gerontol*. 2021;143(August 2020):111162-111162. doi:10.1016/j.exger.2020.111162

481. Oikonomou EK, Antoniadou C. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(2):83-99. doi:10.1038/s41569-018-0097-6
482. Kaburagi T, Kizuka Y, Kitazume S, Taniguchi N. The inhibitory role of α 2,6-sialylation in adipogenesis. *J Biol Chem*. 2017;292(6):2278-2286. doi:10.1074/jbc.M116.747667
483. Liberale L, Bonaventura A, Vecchiè A, et al. The Role of Adipocytokines in Coronary Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(2). doi:10.1007/s11883-017-0644-3
484. Iona A, Bragg F, Guo Y, et al. Adiposity and risks of vascular and non-vascular mortality among Chinese adults with type 2 diabetes: a 10-year prospective study. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2022;10(1):e002489. doi:10.1136/bmjdr-2021-002489
485. Bhaskaran K, Douglas I, Forbes H, dos-Santos-Silva I, Leon DA, Smeeth L. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5.24 million UK adults. *The Lancet*. 2014;384(9945):755-765. doi:10.1016/S0140-6736(14)60892-8
486. Miles FL, Orlich MJ, Mashchak A, et al. The Biology of Veganism: Plasma Metabolomics Analysis Reveals Distinct Profiles of Vegans and Non-Vegetarians in the Adventist Health Study-2 Cohort. *Nutrients*. 2022;14(3). doi:10.3390/nu14030709
487. Miles FL, Lloren JIC, Haddad E, et al. Plasma, Urine, and Adipose Tissue Biomarkers of Dietary Intake Differ Between Vegetarian and Non-Vegetarian Diet Groups in the Adventist Health Study-2. *J Nutr*. 2019;149(4):667-675. doi:10.1093/jn/nxy292
488. Tonstad S, Stewart K, Oda K, Batech M, Herring RP, Fraser GE. Vegetarian diets and incidence of diabetes in the Adventist Health Study-2. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013;23(4):292-299. doi:10.1016/j.numecd.2011.07.004
489. Tharrey M, Mariotti F, Mashchak A, Barbillon P, Delattre M, Fraser GE. Patterns of plant and animal protein intake are strongly associated with cardiovascular mortality: the Adventist Health Study-2 cohort. *Int J Epidemiol*. 2018;47(5):1603-1612. doi:10.1093/ije/dyy030
490. Fraser G, Katuli S, Anousheh R, Knutsen S, Herring P, Fan J. Vegetarian diets and cardiovascular risk factors in black members of the Adventist Health Study-2. *Public Health Nutr*. 2015;18(3):537-545. doi:10.1017/S1368980014000263
491. Berghuis AY, Pijnenborg JFA, Boltje TJ, Pijnenborg JMA. Sialic acids in gynecological cancer development and progression: Impact on diagnosis and treatment. *Int J Cancer*. 2022;150(4):678-687. doi:10.1002/ijc.33866
492. Dhingra R, Vasan RS. Biomarkers in cardiovascular disease: Statistical assessment and section on key novel heart failure biomarkers. *Trends Cardiovasc Med*. 2017;27(2):123-133. doi:10.1016/j.tcm.2016.07.005

493. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(1):231-247. doi:10.1007/s00216-011-5308-5
494. Fu Q, Liang T, Li Z, et al. Separation of carbohydrates using hydrophilic interaction liquid chromatography. *Carbohydr Res.* 2013;379:13-17. doi:10.1016/j.carres.2013.06.006
495. Serafimov K, Knappe C, Li F, Sievers-Engler A, Lämmerhofer M. Solving the retention time repeatability problem of hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2024;1730:465060. doi:10.1016/j.chroma.2024.465060
496. Thompson JW, Kaiser TJ, Jorgenson JW. Viscosity measurements of methanol–water and acetonitrile–water mixtures at pressures up to 3500 bar using a novel capillary time-of-flight viscometer. *J Chromatogr A.* 2006;1134(1):201-209. doi:10.1016/j.chroma.2006.09.006
497. Tang K, Page JS, Marginean I, Kelly RT, Smith RD. Improving Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Sensitivity Using a Subambient Pressure Ionization with Nanoelectrospray (SPIN) Interface. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2011;22(8):1318-1325. doi:10.1007/s13361-011-0135-7
498. Wortmann A, Kistler-Momotova A, Zenobi R, Heine MC, Wilhelm O, Pratsinis SE. Shrinking Droplets in Electrospray Ionization and Their Influence on Chemical Equilibria. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2007;18(3):385-393. doi:10.1016/j.jasms.2006.10.010
499. Galeano Garcia P, Zimmermann BH, Carrazzone C. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry and Multivariate Analysis of the De Novo Pyrimidine Pathway Metabolites. *Biomolecules.* 2019;9(8):328. doi:10.3390/biom9080328
500. Markert C, Thinius M, Lehmann L, et al. Observation of charged droplets from electrospray ionization (ESI) plumes in API mass spectrometers. *Anal Bioanal Chem.* 2021;413(22):5587-5600. doi:10.1007/s00216-021-03452-y
501. Cramer B, Humpf HU. 3 - Applications of HPLC-MS techniques for the analysis of chemical contaminants and residues in food. In: Schrenk D, ed. *Chemical Contaminants and Residues in Food.* Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing; 2012:62-78. doi:10.1533/9780857095794.1.62
502. George R, Haywood A, Khan S, Radovanovic M, Simmonds J, Norris R. Enhancement and Suppression of Ionization in Drug Analysis Using HPLC-MS/MS in Support of Therapeutic Drug Monitoring: A Review of Current Knowledge of Its Minimization and Assessment. *Ther Drug Monit.* 2018;40(1):1-8. doi:10.1097/FTD.0000000000000471
503. Alpert AJ. Effect of salts on retention in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A.* 2018;1538:45-53. doi:10.1016/j.chroma.2018.01.038

504. Taylor MR, Kawakami J, McCalley DV. Managing sample introduction problems in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2023;1700:464006. doi:10.1016/j.chroma.2023.464006
505. Campi B, Codini S, Bisoli N, et al. Quantification of d-mannose in plasma: Development and validation of a reliable and accurate HPLC-MS-MS method. *Clin Chim Acta*. 2019;493:31-35. doi:10.1016/j.cca.2019.02.024
506. Ciccimaro E, Blair I. Stable-Isotope Dilution LC–MS for Quantitative Biomarker Analysis. *Bioanalysis*. 2010;2(2):311-341.
507. Cheng WL, Markus C, Lim CY, et al. Calibration Practices in Clinical Mass Spectrometry: Review and Recommendations. *Ann Lab Med*. 2023;43(1):5-18. doi:10.3343/alm.2023.43.1.5
508. Schulze B, Jeon Y, Kaserzon S, et al. An assessment of quality assurance/quality control efforts in high resolution mass spectrometry non-target workflows for analysis of environmental samples. *TrAC Trends Anal Chem*. 2020;133:116063. doi:10.1016/J.TRAC.2020.116063
509. Evans AM, Fornasini G, Meola TR, et al. Impact of Food on the Oral Absorption of N-Acetyl-D-Mannosamine in Healthy Men and Women. *Orig Artic Clin Pharmacol Drug Dev*. 2024;2024(8):876-883. doi:10.1002/cpdd.1433
510. İliklerden ÜH, Peksen C, Kalayci T, Kemik O. Evaluation of preoperative and postoperative total serum sialic acid levels in patients with colon cancer. *Ann Ital Chir*. 2020;91:649-647.
511. Morimoto N, Nakano M, Kinoshita M, et al. Specific Distribution of Sialic Acids in Animal Tissues As Examined by LC–ESI-MS after Derivatization with 1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzene. *Anal Chem*. 2001;73(22):5422-5428. doi:10.1021/ac0104328
512. Wu C, Xia L, Liu L, et al. A novel, sensitive and convenient method for determination of sialic acids in human serum utilizing ultrasonic-assisted closed in-syringe hydrolysis and derivatization prior to high performance liquid chromatography. *Anal Methods*. 2016;8(3):554-563. doi:10.1039/C5AY02648B
513. Han B, Park JW, Kang M, et al. Simultaneous analysis of monosaccharides using ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry without derivatization for validation of certified reference materials. *J Chromatogr B*. 2020;1160:122370. doi:10.1016/j.jchromb.2020.122370
514. Ogawa K, Takeuchi Y, Matsumoto I. Short Communication Determination of N-acetylneuraminic acid and N-glycolylneuraminic acid in glycoproteins by high-performance liquid chromatography without derivatization. *J Chromatography*. 1993;612:0-4.

515. Sackstein R, Hoffmeister KM, Stowell SR, Kinoshita T, Varki A, Freeze HH. Glycans in Acquired Human Diseases. In: *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. doi:10.1101/GLYCOBIOLOGY.4E.46
516. Bosch JVD, Oemardien LF, Srebniak MI, et al. Prenatal screening of sialic acid storage disease and confirmation in cultured fibroblasts by LC-MS/MS. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(5):1069-1073. doi:10.1007/S10545-011-9351-3
517. Wart SV, Donald ·, Mager E, Bednasz CJ, Huizing M, Carrillo N. Population Pharmacokinetic Model of N-acetylmannosamine (ManNAc) and N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in Subjects with GNE Myopathy. *Drugs RD*. 2021;21:189-202. doi:10.1007/s40268-021-00343-6
518. Gobburu ALP, Kipruto EW, Inman DM, Anderson DJ. A new LC-MS/MS technique for separation of gangliosides using a phenyl-hexyl column: Systematic separation according to sialic acid class and ceramide subclass. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2021;44(1-2):114-125. doi:10.1080/10826076.2020.1856136
519. Li H, Liu Y, Wang Z, et al. Mass spectrometry-based ganglioside profiling provides potential insights into Alzheimer's disease development. *J Chromatogr A*. 2022;1676:463196. doi:10.1016/J.CHROMA.2022.463196
520. Abdella N, Akanji AO, Mojiminiyi OA, Assoussi AA, Moussa M. Relation of serum total sialic acid concentrations with diabetic complications and cardiovascular risk factors in Kuwaiti Type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000;50(1):65-72. doi:10.1016/S0168-8227(00)00144-3
521. Olaru O, Constantin G, Pena C. Variation of total serum sialic acid concentration in postmenopausal women. *Exp Ther Med*. 2020;20(3):2455-2459. doi:10.3892/etm.2020.8873
522. Gebrehiwot AG, Melka DS, Kassaye YM, et al. Healthy human serum N-glycan profiling reveals the influence of ethnic variation on the identified cancer-relevant glycan biomarkers. *PLoS ONE*. 2018;13(12):e0209515. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0209515
523. Butler FM, Utt J, Mathew RO, et al. Plasma metabolomics profiles in Black and White participants of the Adventist Health Study-2 cohort. *BMC Med*. 2023;21(1):408. doi:10.1186/s12916-023-03101-4
524. Pham ND, Pang PC, Krishnamurthy S, et al. Effects of altered sialic acid biosynthesis on N-linked glycan branching and cell surface interactions. *J Biol Chem*. 2017;292(23):9637-9651. doi:10.1074/jbc.M116.764597
525. Neu C, Linus W, Astrid G, Rüdiger H. GNE deficiency impairs Myogenesis in C2C12 cells and cannot be rescued by ManNAc supplementation. *Glycobiology*. 2024;13(8):876-883. doi:doi.org/10.1093/glycob/cwae004

526. Li MN, Qian SH, Yao ZY, et al. Correlation of serum N-Acetylneuraminic acid with the risk and prognosis of acute coronary syndrome: a prospective cohort study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2020;20(1):404. doi:10.1186/s12872-020-01690-z
527. Zhang W, Zhou L, Huang X, et al. Preventive and controlling effects of N - acetylneuraminic acid in regulating glucose and lipid metabolism disorders via the gut-liver axis in high-fat diet mice. *Food Funct.* 2025;16(12):5151-5165. doi:10.1039/D5FO00484E
528. Artemenko C, Giannouli V, Nuerk HC. Age-related effects in magnitude and place-value processing. *Sci Rep.* 2024;14(1):13645. doi:10.1038/s41598-024-63298-z
529. Taniguchi S, Kuwahara M, Ito K. Chronic administration of N-acetyl-d-mannosamine improves age-associated impairment of long-term potentiation in the senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett.* 2015;598:41-46. doi:10.1016/J.NEULET.2015.05.011
530. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014;69 Suppl 1:S4-9. doi:10.1093/gerona/glu057
531. Saavedra D, Añé-Kourí AL, Barzilai N, et al. Aging and chronic inflammation: highlights from a multidisciplinary workshop. *Immun Ageing A.* 2023;20(1):25. doi:10.1186/s12979-023-00352-w
532. DiLoreto R, Murphy CT. The cell biology of aging. *Mol Biol Cell.* 2015;26(25):4524-4531. doi:10.1091/mbc.E14-06-1084
533. Jeon S, Jeon Y, Lim JY, Kim Y, Cha B, Kim W. Emerging regulatory mechanisms and functions of biomolecular condensates: implications for therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10(1):4. doi:10.1038/s41392-024-02070-1
534. Tadokoro T, Yamamoto K, Kuwahara I, et al. Preferential reduction of the α -2-6-sialylation from cell surface N-glycans of human diploid fibroblastic cells by in vitro aging. *Glycoconj J.* 2006;23(5-6):443-452. doi:10.1007/S10719-006-7152-Y/METRICS
535. Ghosh P. Deciphering the Cell Surface Sugar-Coating via Biochemical Pathways. *Chem – Eur J.* 2024;30(64):e202401983. doi:10.1002/CHEM.202401983
536. Ohyama Y, Yamaguchi H, Ogata S, et al. Racial heterogeneity of IgA1 hinge-region O-glycoforms in patients with IgA nephropathy. *iScience.* 2022;25(11):105223. doi:10.1016/J.ISCI.2022.105223
537. Ouyang R, Zheng S, Wang X, et al. Crosstalk between Breast Milk N-Acetylneuraminic Acid and Infant Growth in a Gut Microbiota-Dependent Manner. *Metabolites.* 2023;13(7):846. doi:10.3390/METABO13070846/S1
538. Valianpour F, Abeling NGGM, Duran M, Huijtmans JGM, Kulik W. Quantification of Free Sialic Acid in Urine by HPLC-Electrospray Tandem Mass Spectrometry: A Tool for the

- Diagnosis of Sialic Acid Storage Disease. *Clin Chem*. 2004;50(2):403-409. doi:10.1373/clinchem.2003.027169
539. Salminen A. Increased immunosuppression impairs tissue homeostasis with aging and age-related diseases. *J Mol Med Berl Ger*. 2021;99(1):1-20. doi:10.1007/s00109-020-01988-7
 540. Santos HD, Alabadi-Bierman A, Paalani M, et al. Living longer and lifestyle: A report on the oldest of the old in the Adventist Health Study-2. *J Aging Res Lifestyle*. 2025;14:100010. doi:10.1016/j.jarlif.2025.100010
 541. Wang J, Chen C, Zhou J, et al. Healthy lifestyle in late-life, longevity genes, and life expectancy among older adults: a 20-year, population-based, prospective cohort study. *Lancet Healthy Longev*. 2023;4(10):e535-e543. doi:10.1016/S2666-7568(23)00140-X
 542. Nemanichvili N, Spruit CM, Berends AJ, et al. Wild and domestic animals variably display Neu5Ac and Neu5Gc sialic acids. *Glycobiology*. Published online June 1, 2022:cwac033. doi:10.1093/glycob/cwac033
 543. Chen Y, Pan L, Liu N, Troy FA, Wang B. LC–MS/MS quantification of *N*-acetylneuraminic acid, *N*-glycolylneuraminic acid and ketodeoxynonulosonic acid levels in the urine and potential relationship with dietary sialic acid intake and disease in 3- to 5-year-old children. *Br J Nutr*. 2014;111(2):332-341. doi:10.1017/S0007114513002468
 544. Kinoshita M, Yamamoto S, Suzuki S. Age-Related Changes in O-Acetylation of Sialic Acids Bound to N-Glycans of Male Rat Serum Glycoproteins and Influence of Dietary Intake on Their Changes. *ACS Omega*. 2020;5(30):18608-18618. doi:10.1021/acsomega.0c00935
 545. Pietrobono S, Stecca B. Aberrant sialylation in cancer: Biomarker and potential target for therapeutic intervention? *Cancers*. 2021;13(9). doi:10.3390/cancers13092014
 546. Zhang H, Liu S, Wang Y, et al. Deep learning enhanced the diagnostic merit of serum glycome for multiple cancers. *iScience*. 2024;27(1):108715. doi:10.1016/J.ISCI.2023.108715