



**FACULTAD DE
CIENCIAS**
UDELAR | fcien.edu.uy



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**

Tesina de Graduación

Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias - Universidad de la República

FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO: PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO PARA SU PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Santiago Garcimartín Pereira

Orientadora: Dra. Silvina Bartesaghi

Co-orientadora: Lic. Florencia Tomasina



CEINBIO
Centro de Investigaciones Biomédicas
Universidad de la República - Montevideo | UY

Centro de Investigaciones Biomédicas

Facultad de Medicina - Universidad de la República

Diciembre de 2020, Montevideo, Uruguay

Agradecimientos

A Rafael, por hacerme un lugar en este laboratorio de gente excelente. A mis tutoras: Silvina, por haberme introducido a la bioquímica y por toda la ayuda en este trabajo y los futuros, y Florencia, por todo el tiempo dedicado y el contagio de las ganas de trabajar y, sobre todo, de las buenas prácticas. También al resto del CEINBIO por la ayuda del día a día, y particularmente a Lucía P, Bruno, y Mauricio, por su disposición y discusiones relevantes.

A mi familia, en particular a mis padres, hermana y abuelos, por las oportunidades y porque siempre me empujaron hacia adelante a lo largo de la carrera.

A mis amigos de la vida y especialmente a mis compañeros de licenciatura, ya también amigos, con los que compartí estos años de estudio: Andi, Tincho, Caro, Manu, Vicky, Flo y Magui.

Finalmente, a la Universidad de la República, por permitirme una formación gratuita y de máximo nivel.

Tabla de contenido

1. Resumen	IV
2. Introducción.....	1
2.1. Factores neurotróficos	1
2.2. Factor de crecimiento nervioso.....	2
2.2.1. Descubrimiento.....	2
2.2.2. Estructura	2
2.2.3. Vía metabólica del NGF.....	6
2.3. Mecanismos de señalización del NGF.....	7
2.3.1. Receptor p75NTR.....	8
2.3.2. Receptor TrkA.....	9
2.3.3. Otros receptores: Sortilina y RAGE	10
2.4. Relevancia biológica del NGF	11
2.5. Patologías asociadas.....	13
2.5.1. Neurodegeneración	13
2.5.2. Cáncer	14
2.6. Protocolos de purificación.....	15
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo general	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. Materiales y métodos	17
4.1. Materiales.....	17
4.2. Métodos	17
4.2.1. Empaquetado de columnas de exclusión molecular.....	17
4.2.1.1. Sephacryl S-200	17
4.2.1.2. Sephacryl S-100	18
4.2.2. Purificación de NGF	19

4.2.2.1. Homogeneizado.....	19
4.2.2.2. Exclusión molecular 1	19
4.2.2.3. Cromatografía de intercambio catiónico	19
4.2.2.4. Exclusión molecular 2.....	20
4.2.2.5. Diálisis y almacenamiento	21
4.2.3. Análisis de las muestras y caracterización bioquímica.....	21
4.2.3.1. SDS-PAGE	21
4.2.3.2. Western blot.....	21
4.2.4. Ensayo de actividad NGF	22
5. Resultados y discusión	23
5.1. Empaquetado de columnas de exclusión molecular.....	23
5.2. Purificación de NGF	25
5.2.1. Homogeneizado.....	25
5.2.2. Exclusión molecular 1	26
5.2.3. Cromatografía de intercambio catiónico	29
5.2.4. Exclusión molecular 2	35
5.2.5. Evaluación de los pasos de purificación y rendimiento	38
5.3. Ensayo de actividad NGF	40
6. Conclusiones y perspectivas.....	42
7. Referencias bibliográficas	45

1. Resumen

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una proteína miembro de la familia de las neurotrofinas que cumple un rol importante en la supervivencia, el desarrollo y la fisiología neuronal del sistema nervioso central así como también del periférico. Está involucrado en la señalización a través de diferentes vías, tanto durante el desarrollo como en la vida adulta, donde promueve la supervivencia y maduración de diferentes poblaciones neuronales que expresan los receptores TrkA y p75^{NTR}.

En la bibliografía existen numerosos protocolos de purificación de NGF que varían en su metodología, permitiendo la purificación de distintas proteoformas de esta proteína que se diferencian según su grado de proteólisis limitada en ambos extremos de la cadena polipeptídica.

En el presente trabajo se evaluó la viabilidad de un protocolo para la purificación de NGF a partir de glándulas submaxilares de ratones macho adultos, una fuente importante de esta proteína. Los diferentes pasos del protocolo de purificación fueron puestos a punto y se logró obtener una fracción final en la cual el NGF representa la proteína mayoritaria, con rendimientos comparables a los de la bibliografía. La actividad de esta fracción fue evaluada mediante un ensayo de diferenciación sobre células PC12, un método ya establecido con este fin, lográndose determinar que la proteína se encuentra en su forma biológicamente activa y que, por lo tanto, no pierde actividad en el proceso de purificación.

Palabras clave: BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS; FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO; NGF; PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

2. Introducción

2.1. Factores neurotróficos

Las neurotrofinas o factores neurotróficos son una familia de proteínas que controlan diferentes aspectos de la supervivencia, el desarrollo y la fisiología neuronal, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Además del factor de crecimiento nervioso (NGF), otras neurotrofinas han sido caracterizadas: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4 (NT-4/5). Los cuatro miembros de esta familia comparten homología estructural y de secuencia. Sus productos génicos contienen una secuencia señal y un pro-dominio, seguido de la secuencia del factor neurotrófico maduro [1]. Sus actividades se encuentran reguladas por peptidasas responsables de la activación, constituyendo una instancia de regulación post-traducciona. En su forma madura, los factores neurotróficos son homodímeros que se mantienen unidos por interacciones no covalentes entre hojas plegadas beta, favorecidas por aminoácidos hidrofóbicos altamente conservados [2].

En el cerebro, la síntesis y liberación de neurotrofinas tiene lugar en regiones específicas y su expresión en neuronas se encuentra regulada por la actividad eléctrica. En otros tipos celulares como los astrocitos la expresión estaría regulada por citoquinas inflamatorias mientras que en la periferia estaría sometida a control autónomo [3].

Las neurotrofinas ejercen sus funciones mediante su unión a distintos receptores de superficie que desencadenan vías de señalización intracelular. Uno de estos receptores es el receptor $p75^{NTR}$, el cual une a las cuatro neurotrofinas con una afinidad similar. Otros receptores son los de la subfamilia Trk, que unen a las neurotrofinas con una afinidad mayor y de forma específica, aunque también existe cierto grado de reactividad cruzada, debido a la homología que existe entre los diferentes miembros de esta familia [1].

Además de cumplir funciones tróficas, manteniendo la viabilidad neuronal, las neurotrofinas pueden modular la transmisión sináptica [4] y existe evidencia de que están involucradas en la plasticidad del sistema nervioso [5].

2.2. Factor de crecimiento nervioso

2.2.1. Descubrimiento

El factor de crecimiento nervioso (NGF) fue el primer miembro de la familia de las neurotrofinas en ser descubierto. A principios de la década de los cincuenta, los investigadores Levi-Montalcini y Hamburger estudiaron la capacidad de determinadas líneas celulares de sarcoma murino de aumentar el tamaño y la proliferación celular, acelerar la diferenciación neuronal y generar una distribución atípica de las fibras nerviosas en ganglios del sistema nervioso simpático de embriones de pollo [6-8]. En estos trabajos se demostró que estas acciones eran ejercidas por un agente difusible liberado por las células tumorales, que un año después se logró localizar en la fracción lisosomal, la cual contenía proteínas y ácidos nucleicos [9]. En un esfuerzo por caracterizar este agente difusible con actividad trófica, Cohen utilizó veneno de serpiente como fuente de fosfodiesterasas para degradar el componente ácido nucleico de la fracción y así estudiar si el preparado conservaba su actividad. Inesperadamente, el tratamiento con veneno de serpiente aumentó la actividad del preparado a partir de sarcoma y se observó que el propio veneno tenía actividad neurotrófica intrínseca. A partir de estas observaciones, se aisló el NGF del veneno de serpiente y se determinó su naturaleza proteica [10]. Considerando que el veneno de serpiente es secretado por una glándula salival modificada, se procedió a ensayar la purificación de NGF a partir de glándulas salivales de ratones, logrando obtenerlo en una forma más activa y en mayor cantidad [11].

Estas y otras contribuciones dieron lugar a la entrega del premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1986 a los investigadores Rita Levi-Montalcini y Stanley Cohen, el cual les fue otorgado “por el descubrimiento de los factores de crecimiento” [12].

2.2.2. Estructura

La elucidación de la estructura del NGF comenzó en 1967, cuando se logró la purificación del mismo a partir de glándulas submaxilares de ratón en una forma de mayor peso molecular que se denominó NGF 7S [13]. La estructura del NGF 7S, representada en la Figura 1, que solo se ha encontrado en este tejido, consiste de un dímero de subunidades β sobre el cual reside la actividad neu-

rotrónica, al que se encuentran asociadas dos copias de dos subunidades: α y γ , dando lugar a la formación de un hexámero.

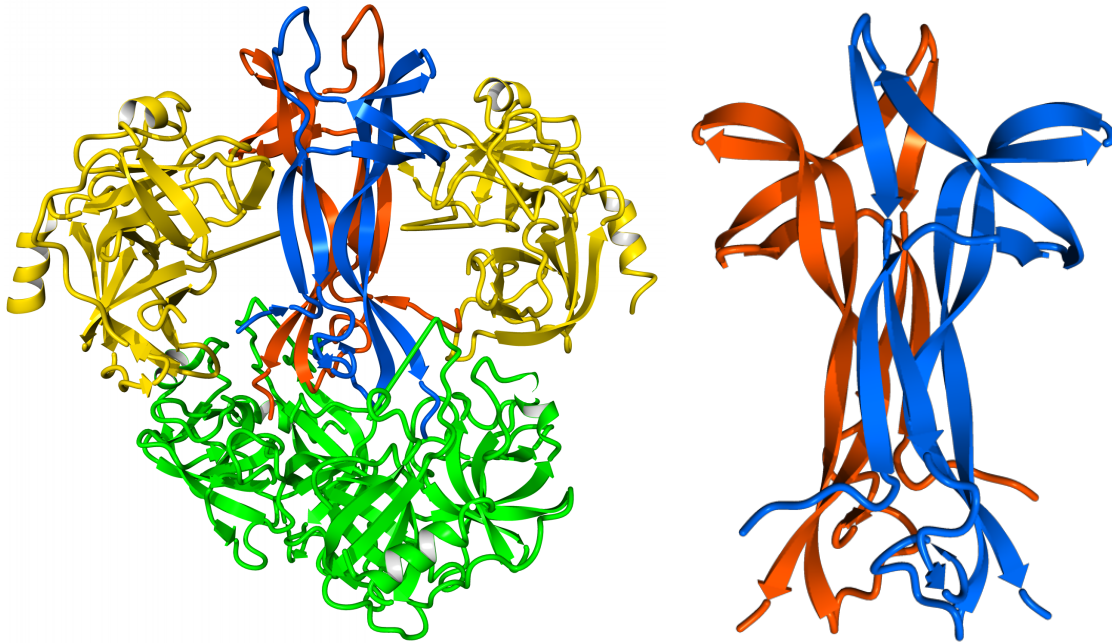


Figura 1. Estructura del factor de crecimiento nervioso. Estructura del NGF 7S (izquierda) y 2.5S (derecha). En amarillo se representan las subunidades α , en azul y naranja las subunidades β , y en verde las subunidades γ . Extraído de Protein Data Bank (PDB): 1SGF y 1BET, respectivamente.

La estructura primaria de la subunidad β del NGF (Figura 2) fue determinada en 1971. La misma está formada por 118 aminoácidos y presenta tres enlaces disulfuro que se disponen en el orden I-IV, II-V, III-VI a lo largo de la cadena polipeptídica. Se determinó que existe una fracción de subunidades β de 110 aminoácidos de largo que resulta de la proteólisis limitada del octapéptido amino terminal: Ser-Ser-Thr-His-Pro-Val-Phe-His. La proporción de la forma clivada depende del protocolo de purificación, ya que tiene lugar debido a proteasas presentes en el homogeneizado de glándula submaxilar de ratón [14].

En las glándulas se ha encontrado el octapéptido libre bajo condiciones de estrés, y aunque su relevancia a nivel fisiológico no está clara, se ha sugerido, debido a su similitud estructural, que el octapéptido liberado podría tener actividad tipo bradiquinina, observándose que el mismo genera una disminución en el umbral del dolor en zonas de la piel donde tuvo lugar una herida [15].

Un segundo nivel de heterogeneidad en el NGF se conoció cuando se observó que el aminoácido carboxilo terminal, inicialmente determinado como arginina, también podía ser treonina. Esta diferencia surge del clivaje del residuo de arginina y da lugar a una subunidad β de 117 aminoácidos [16]. Nuevamente, se encontró que la proporción de subunidades β carentes del residuo de arginina también dependía del protocolo utilizado para la purificación.

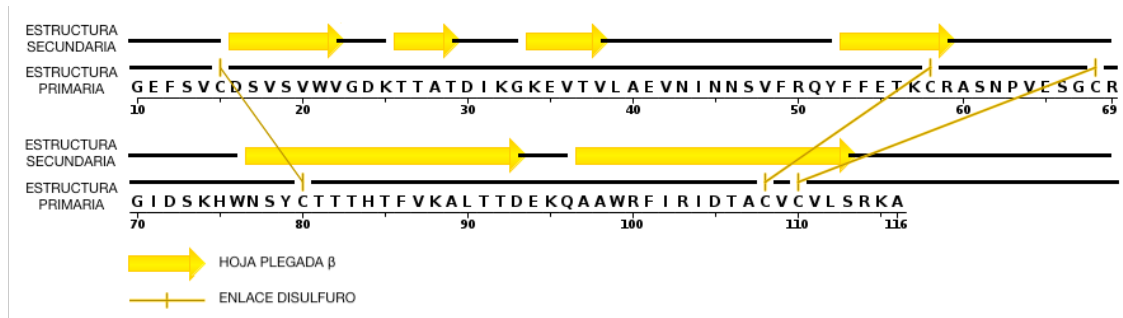


Figura 2. Estructura del factor de crecimiento nervioso. Estructura primaria del NGF y representación esquemática de su estructura secundaria. Imagen modificada de PDB: 1BET [20].

Para poder referirse a las distintas formas de NGF de forma no ambigua, se desarrolló una nomenclatura que considera los distintos grados de proteólisis limitada. En la misma, las subunidades β que conservan el péptido amino terminal se denominan “A” mientras que las que lo hayan perdido se denominan “B”. Para referirse al extremo carboxilo terminal se utilizan las letras “R” y “T” como superíndices según si el aminoácido es arginina o treonina, respectivamente.

Debido a gran extensión de un protocolo de purificación desarrollado por Bocchini y Angeletti en 1969, se pasó a denominar al dímero de subunidades β AB con un 84% de cadenas con arginina como aminoácido carboxilo terminal como NGF 2.5S (Figura 1) [17].

En 1989 se caracterizó otra forma de NGF 2.5S que ya había sido descrita anteriormente [18]. En este trabajo se determinó que la misma representa el 2% del NGF total y se corresponde con una forma glicosilada de la proteína. Esta glicosilación se da por adición del monosacárido glucosamina y tiene lugar en el residuo de asparagina Asn45. Esta modificación ocurre indistintamente en las cadenas A y B, y no afecta la actividad neurotrófica del NGF [19].

La cristalización y determinación de la estructura tridimensional del β NGF en 1991 permitió el análisis de niveles de estructura superiores [20].

Como había sido anticipado anteriormente mediante espectroscopía Raman, la estructura secundaria del β NGF consiste principalmente de seis hojas plegadas β [21], las cuales se disponen de forma antiparalela en grupos de dos. La gran torsión a lo largo de las hojas plegadas β y la interfaz entre los tres grupos da lugar a la formación de un núcleo hidrofóbico formado por residuos de valina, fenilalanina, isoleucina, y alanina. El alto grado de conservación de secuencia entre distintas neurotrofinas, y a través de distintos organismos, en residuos importantes estructuralmente sugiere una estructura tridimensional compartida [20].

Dos subunidades de NGF se asocian disponiendo su eje mayor de forma casi paralela para dar lugar a un dímero de β NGF que se mantiene unido mediante interacciones hidrofóbicas (Figura 3A), con una afinidad muy alta ($K_D = 10^{-13}$).

En la estructura terciaria se observa una agrupación de diez residuos cargados positivamente (39% de los residuos cargados totales), que da lugar a una superficie continua con carga positiva (Figura 3B), la cual se identificó como un potencial sitio de unión al receptor $p75^{NTR}$ mediante mutagénesis sitio-dirigida.

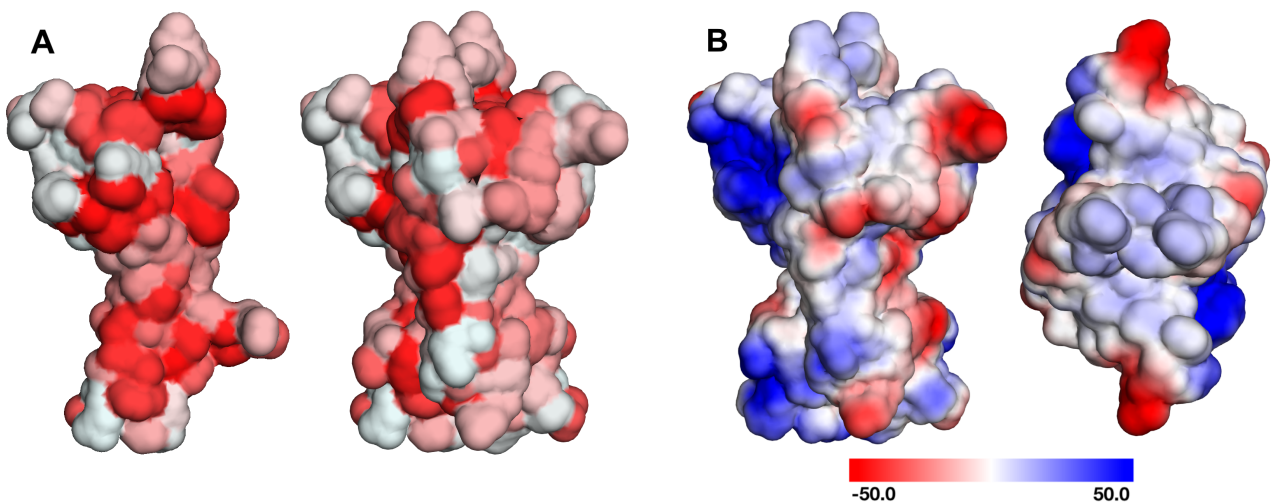


Figura 3. Superficie accesible al solvente del NGF. Superficie del NGF mapeada según (A) hidrofobicidad, sobre monómero y dímero, y (B) potencial electrostático ($-50 K_B T/e_c$ a $+50 K_B T/e_c$) sobre el dímero, vista longitudinal y axial.

El 75% de la variabilidad en la secuencia de los distintos miembros de la familia de las neurotrofinas se da en los tres bucles formados por las hojas plegadas β antiparalelas, muy importantes en el reconocimiento por parte del receptor, ya que le confieren especificidad de unión a cada neurotrofina [20].

Como se mencionó anteriormente, solo cuando se purifica a partir de glándulas submaxilares de ratón, el NGF está compuesto por tres tipos de subunidades que se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes y su disociación mediante cambios en el pH no imposibilita su re-asociación a pH fisiológico [22].

Las subunidades α y γ pertenecen a una familia de proteasas de serina: las callicreínas, exclusivas del tejido en cuestión. A pesar de tener una secuencia aminoacídica similar, solo la subunidad γ es catalíticamente activa. Se cree que las mutaciones acumuladas en la subunidad α resultaron en la pérdida de actividad y favorecen la interacción entre subunidades. A pesar de la existencia de este complejo NGF 7S, el dímero de subunidades β o NGF 2.5S es la principal forma activa. De hecho, las subunidades α y γ inhiben la actividad neurotrófica del NGF [23].

Además, en esta forma, el NGF 7S une dos átomos de Zn^{2+} con una gran afinidad ($K_D = 10^{-10}$), fundamentales para la estructura del complejo y que mantienen inhibida la actividad proteolítica de la subunidad γ [24, 25].

2.2.3. Vía metabólica del NGF

La complejidad en la síntesis, procesamiento y degradación del NGF llevó a la definición de una vía metabólica en la que están involucradas varias enzimas y proteínas reguladoras (Figura 4). La misma comienza con la síntesis de pro-NGF por parte de las neuronas, seguida de su liberación, que ocurre de forma dependiente de la actividad sináptica. El proNGF liberado es convertido a NGF maduro por la enzima plasmina, una proteasa de serina que tiene como zimógeno al plasminógeno, cuya activación por proteólisis limitada es llevada a cabo por el activador tisular de plasminógeno (tPA). La neuroserpina es el principal inhibidor del tPA en las regiones blanco del prosencéfalo, regulando esta conversión [26].

El NGF maduro solo existe de forma transitoria en el espacio extracelular ya que en caso de no darse la unión a alguno de sus receptores, el mismo es degradado por la metaloproteasa de la matriz extracelular 9 (MMP-9). Este paso está regulado por el inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TiMP1). Todas las enzimas, zimógenos y factores reguladores son secretados junto al proNGF al espacio extracelular frente a la estimulación neuronal.

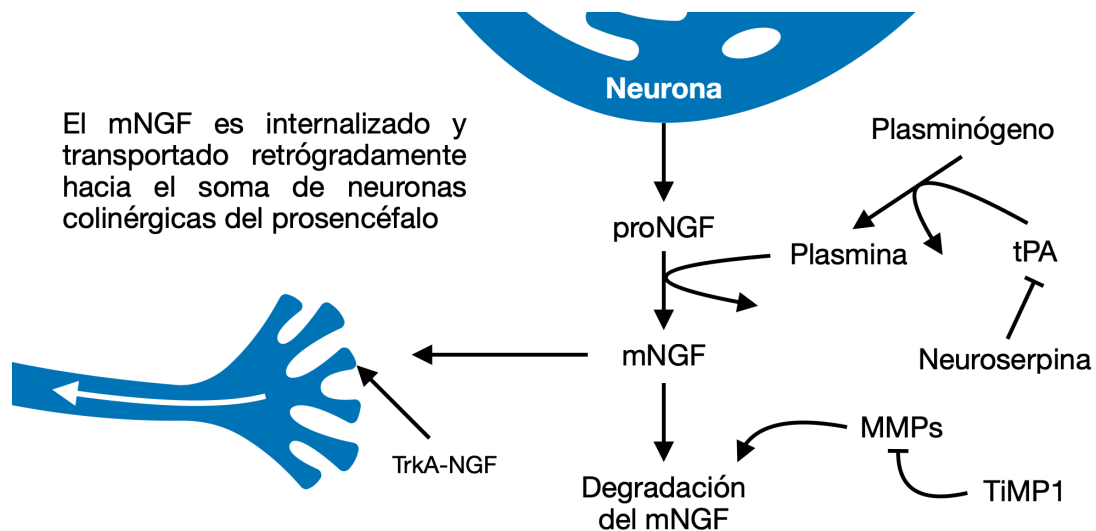


Figura 4. Vía metabólica del NGF. Mecanismo de síntesis, maduración y degradación del NGF, así como también las enzimas y proteínas reguladoras implicadas en la vía. Adaptado de [26].

Cualquier desbalance en alguno de los pasos de la vía puede comprometer el sistema colinérgico del prosencéfalo, un fenómeno observado en el Alzheimer y en el síndrome de Down [26].

Mediante western blot se determinó la ausencia de NGF maduro en el cerebro humano, siendo el proNGF la forma predominante en diferentes regiones cerebrales. Éste es entonces convertido en su forma madura según sea necesario [27].

2.3. Mecanismos de señalización del NGF

La respuesta celular frente al NGF se desencadena luego de su unión a los receptores TrkA y p75^{NTR} mediante mecanismos de señalización complejos que dependen del contexto celular y son regulados de forma dinámica. A nivel intracelular se desencadenan diferentes cascadas de señalización que se ramifi-

can, convergen e interaccionan con otros procesos de señalización iniciados por otras moléculas (Figura 5) [28].

2.3.1. Receptor p75^{NTR}

El receptor p75^{NTR} fue el primer receptor de NGF en ser identificado, inicialmente como un receptor de baja afinidad. Más adelante se demostró que es capaz de ser activado por todos los miembros de la familia de las neurotrofinas con una afinidad similar. Es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral y contiene un dominio citoplasmático de muerte [1].

La cascada de señalización desencadenada por la unión de NGF al receptor p75^{NTR} no está completamente elucidada, aunque se sabe que la misma resulta en la activación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y promueve la apoptosis. La actividad pro-apoptótica de este receptor predomina cuando su expresión ocurre en ausencia de TrkA y es fundamental durante la ontogénesis [29].

En su forma inmadura, las pro-neurotrofinas tienen un pro-dominio que además de asistir su plegamiento afecta la unión a los receptores p75^{NTR}. Se ha demostrado que el proNGF induce la vía apoptótica a través del receptor p75^{NTR} en algunos tipos neuronales mientras que es incapaz de promover la supervivencia a través del receptor TrkA. Estas observaciones muestran que el proNGF y el NGF maduro generan respuestas celulares opuestas: muerte y supervivencia, respectivamente [29].

La expresión de p75^{NTR} está muy extendida en el sistema nervioso central, fundamentalmente durante el desarrollo. En el adulto, en la mayoría de tipos neuronales, su expresión se reduce a niveles bajos, en algunos casos indetectables. En el sistema nervioso periférico, la expresión de p75^{NTR} tiene lugar en neuronas simpáticas y periféricas que median la nocicepción durante el desarrollo y en la vida adulta. Además, se expresa en motoneuronas durante la elongación axónica en el desarrollo, en casos de heridas en nervios periféricos y en enfermedades como la ELA [28].

2.3.2. Receptor TrkA

El receptor TrkA es una proteína transmembrana que forma parte de la superfamilia de receptores tirosina quinasa. La unión de NGF, específicamente de su forma madura, desencadena la dimerización y transfosforilación de tirosinas, resultando en la activación de la actividad tirosina quinasa. La fosforilación de residuos de tirosina fuera de los dominios de autofosforilación genera sitios de unión a proteínas adaptadoras. A su vez, la fosforilación activa proteínas accesorias que continúan la cascada de señalización [28].

La activación de la vía Ras es necesaria para una diferenciación neuronal normal y promueve la supervivencia de varias subpoblaciones neuronales. Este proceso está mediado por la proteína adaptadora Shc, la cual es reclutada hacia el receptor TrkA activado mediante su sitio de unión a dominios fosfotirosina. El resultado es la activación de la vía MAP quinasa (MAPK), que a través de diferentes factores de transcripción como la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico, activa la transcripción de genes esenciales para la supervivencia y diferenciación neuronal [1].

En algunos tipos neuronales, la activación de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) mediada por Ras desencadena vías a través de las cuales se promueve la supervivencia neuronal. En otras, la activación del receptor TrkA resulta en la fosforilación del sustrato del receptor de insulina, que también recluta y activa a la PI3K. Una de las proteínas activadas por esta vía es la quinasa de serina y treonina Akt, responsable de mantener inhibida la actividad pro-apoptótica de BAD y de esta forma promover la supervivencia [1].

La afinidad del receptor TrkA se ve modulada de forma positiva por el receptor p75^{NTR} a través de dos mecanismos: el primero se debe a la imposibilidad de los receptores p75^{NTR} de formar dímeros de alta afinidad, favoreciendo la unión de NGF a dímeros de receptores TrkA mientras que el segundo surge de la interacción de los dominios citosólicos y transmembrana de ambos receptores. El receptor p75^{NTR} actúa como co-receptor, aumentando la afinidad del receptor TrkA por el NGF e impidiendo la unión de NT-3. Estos mecanismos de modulación de afinidad son muy importantes durante el desarrollo. La interacción también ocurre a nivel de la cascada de señalización, ya que el receptor p75^{NTR} tiene dominios de unión a Shc que permiten el aumento de la señaliza-

ción a través de TrkA. Contrariamente, frente a un fuerte estímulo de NGF se induce el aumento de la expresión de receptores p75^{NTR} que en mayor cantidad compiten por el NGF y disminuyen la disponibilidad de NGF libre para unirse a TrkA [29].

En el sistema nervioso, la expresión de TrkA en neuronas con fenotipo colinérgico del prosencéfalo está regulada por el NGF. Su co-expresión con p75^{NTR} depende de cada tipo neuronal y varía según las regiones estudiadas. A nivel de sistema nervioso periférico, su expresión se limita a neuronas simpáticas y periféricas que median la nocicepción. En células del sistema inmune como linfocitos T CD4+, linfocitos B, monocitos y macrófagos, la expresión de TrkA aumenta cuando las mismas se activan en un contexto inflamatorio [28].

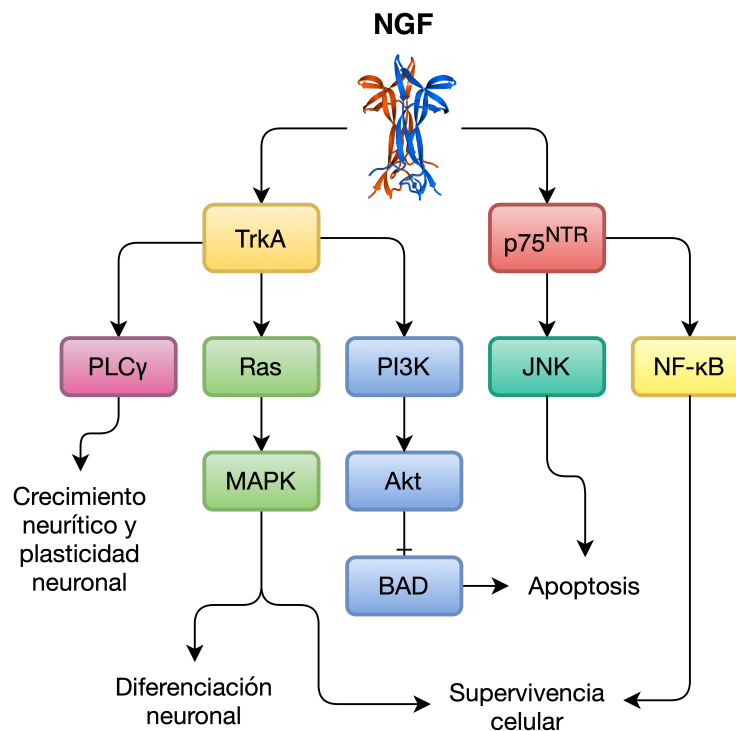


Figura 5. Señalización a través de NGF. Resumen de las principales vías de señalización activadas por NGF. Tanto la maquinaria de señalización como las proteínas efectoras varían en los distintos tipos celulares.

2.3.3. Otros receptores: Sortilina y RAGE

Otro receptor que participa en la señalización a través de NGF es el receptor Sortilina. Su expresión predomina en regiones del sistema nervioso donde no hay presencia de su ligando: la neurotensina. La observación de que no todas

las células que expresan p75^{NTR} responden al proNGF iniciando la vía apoptótica llevó a la determinación de que el receptor Sortilina es necesario para que la misma tenga lugar. En este sentido, actúa como un co-receptor de p75^{NTR} promoviendo la unión de proNGF al mismo y mediando las señales pro-apoptóticas que se desencadenan [30].

Otro receptor que también participa en la señalización a través de NGF es el receptor de productos de glicación avanzada (RAGE). Al igual que ocurre con el receptor p75^{NTR}, el receptor RAGE puede promover la supervivencia o la vía apoptótica, según el contexto de señalización. Su expresión y relevancia es mayor en el proceso de neurodegeneración y será revisada más adelante [31].

2.4. Relevancia biológica del NGF

La expresión de NGF y sus receptores por parte de diferentes tipos celulares y la versatilidad en los mecanismos de señalización intracelular permiten que la señalización a través de NGF esté implicada en varias funciones, tanto durante el desarrollo como en la vida adulta. El NGF puede actuar como factor neuronal dirigido, afectando las neuronas cuando es transportado de forma retrógrada, como factor parácrino, actuando sobre neuronas y otros tipos celulares, como factor autócrino y como factor endócrino, cuando se transporta a través del torrente sanguíneo [28].

En el desarrollo, el NGF promueve la supervivencia y maduración de diferentes poblaciones que expresan TrkA y p75^{NTR}. En el sistema nervioso central actúa sobre neuronas colinérgicas del prosencéfalo y el núcleo estriado mientras que en el sistema nervioso periférico actúa sobre neuronas simpáticas y sensoriales. Ninguno de estos tipos neuronales depende del NGF para su supervivencia durante toda la vida, los estímulos necesarios son dinámicos en las diferentes etapas del desarrollo y la vida adulta. Además de la supervivencia, el NGF media la ramificación axónica, y dirige el elongamiento del cono axónico. El NGF también induce la muerte de determinados tipos neuronales carentes de TrkA, importante durante el desarrollo [28].

Una vez diferenciadas, la mayoría de las neuronas pierden la dependencia de NGF como factor neurotrófico, pero éste adquiere un papel importante en el mantenimiento fenotípico y funcional. La ausencia de NGF resulta en el atro-

pismo neuronal a través de cambios como la reducción del tamaño celular y la disminución en la expresión de genes involucrados en la transmisión sináptica.

Las neurotrofinas funcionan como mediadores moleculares en algunas formas de plasticidad neuronal, permitiendo modificar la estructura y función del sistema nervioso en respuesta a estímulos. En el sistema nervioso central, el NGF regula el tamaño celular, la arborización dendrítica y la expresión génica de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo y núcleo estriado. En el sistema nervioso periférico regula los mismos parámetros pero en neuronas simpáticas y neuronas nociceptivas pequeñas. En estas últimas, la señalización a través de NGF lleva a una hipersensibilidad a estímulos nociceptivos resultado en alodinia e hiperalgesia, tanto mecánica como térmica. En este sentido, el NGF tiene importancia en la respuesta nociceptiva luego de una herida, induciendo sensibilización a nivel central y periférico actuando sobre numerosos tipos celulares [28].

A nivel del sistema inmune, el NGF actúa induciendo la activación de células y de sus funciones efectoras. Activa monocitos, macrófagos y células de la microglía, aumentando su capacidad fagocítica e induciendo la expresión de interleuquina 1, receptores Fc y proteasas lisosomales. Es quimiotáctico para neutrófilos e influencia la proliferación de linfocitos T y B, funcionando como un factor de supervivencia autócrino de éstos últimos y estimulando la producción de anticuerpos [28].

El NGF también tiene actividad neuroprotectora, la cual es ejercida a través de diferentes mecanismos. Uno de éstos es la protección contra la muerte inducida por axotomía, frente a la cual las neuronas que responden a NGF no mueren, aunque pueden desarrollar distintos niveles de atrofia neuronal. Las vías intracelulares que protegen a estas neuronas no están establecidas. Un segundo mecanismo de protección es contra la exitotoxicidad glutamatérgica. Si bien, nuevamente, la vía de señalización y mecanismo implicado en la protección no está elucidado, se ha observado que las células que expresan receptores para NGF muestran una tasa de muerte por exitotoxicidad glutamatérgica mucho menor. Por último, se ha observado que la presencia de NGF es capaz de proteger a las neuronas frente a hipoxia y citotoxicidad por óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) [28].

2.5. Patologías asociadas

2.5.1. Neurodegeneración

La enfermedad de Alzheimer (AD) es la principal causa de demencia en adultos mayores, pudiendo llegar a suponer un 60-70% de los casos [32]. Se caracteriza por la disfunción y pérdida de sinapsis, disminución en el metabolismo neuronal y aparición de placas seniles y ovillos neurofibrilares. Entre las alteraciones que se observan, una de las más consistentes es la pérdida de marcadores colinérgicos en la corteza, hipocampo y prosencéfalo [33].

En los años setenta se postuló la hipótesis colinérgica del AD, la cual atribuye parte del deterioro cognitivo que tiene lugar a la pérdida de fenotipo colinérgico y a la muerte de este tipo de neuronas. Los mecanismos que llevan al deterioro de este tipo neuronal son la disminución en la síntesis de acetilcolina, la susceptibilidad de las neuronas colinérgicas a los péptidos amiloides y un sistema de transporte axonal comprometido. La pérdida de neurotropismo llevaría a la degeneración de este sistema neuronal [34].

Se ha observado que en neuronas colinérgicas del prosencéfalo los niveles de expresión de TrkA y p75^{NTR} disminuyen en etapas tempranas de la enfermedad y que este grado de disminución se correlaciona con el deterioro cognitivo. En regiones corticales y en el hipocampo los niveles de TrkA disminuyen mientras que la expresión de p75^{NTR} se mantiene constante, de forma que se favorece la señalización a través de este último, pudiendo llevar a la activación de la apoptosis o de otras señales que resultan en la disfunción de la sinapsis colinérgica [34].

No solo se observan alteraciones a nivel de los receptores, también ocurre una desregulación de la vía metabólica del NGF. La disminución en los niveles de plasmina y t-PA resultan en una menor conversión de proNGF a NGF maduro llevando a la acumulación de proNGF. A su vez, se da un aumento en la actividad de MMP-9 que degrada el NGF maduro, disminuyendo su concentración aún más. En conjunto, estas dos alteraciones provocan la atrofia de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo y una pérdida de sinapsis colinérgicas a nivel de la corteza y el hipotálamo [26].

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es otra enfermedad neurodegenerativa que afecta a las motoneuronas. Normalmente, este tipo celular no expresa TrkA ni p75^{NTR} durante la vida adulta aunque se ha visto que p75^{NTR} vuelve a expresarse en el contexto de esta enfermedad. La señalización a través de este receptor induce la muerte neuronal, que se ve modulada por la presencia de óxido nítrico [35]. Si bien la concentración fisiológica de NGF no lograría inducir la apoptosis, su modificación por nitración induce la formación de oligómeros que sí son capaces de inducir la apoptosis a concentraciones fisiológicas [36], señalizando a través los receptores p75^{NTR} y RAGE [31]. La glicación es otra modificación que puede sufrir el NGF que tiene las mismas consecuencias funcionales que la nitración [31].

La nitración de NGF también podría ser relevante en el contexto del Alzheimer ya que se ha determinado su presencia *in vivo* en individuos afectados por esta patología [37].

2.5.2. Cáncer

Se ha establecido que el NGF no es suficiente para la transformación de células normales en células cancerígenas ni para mantener la progresión de un cáncer ya establecido. Por el contrario, a pesar de tener actividad trófica, el NGF puede promover la diferenciación celular y de esta forma impedir la progresión tumoral, como ha sido observado *in vitro* para células tumorales PC12 y beta del páncreas [38].

2.6. Protocolos de purificación

Como se comentó anteriormente, la primer fuente de NGF utilizada para su purificación fue el veneno de serpiente. Por motivos ya mencionados, las glándulas submaxilares de ratones macho fueron el segundo tejido a partir del cual se pudo aislar, siendo este la mayor fuente de NGF determinada hasta el momento. Las glándulas submaxilares de ratas y conejos solo permiten obtener un homogeneizado cuya actividad específica es 1000 veces menor a la de ratones machos adultos y en vacas solo se observan trazas de actividad. En cuanto a otros tejidos murinos, las glándulas sublinguales mostraron una actividad 100 veces menor en comparación con las submaxilares y las glándulas parótidas solo trazas de la misma [11].

Estos hallazgos supusieron el desarrollo de múltiples protocolos de purificación de NGF a partir de glándulas submaxilares de ratones macho adultos, que consiguen purificar al NGF en sus distintas proteoformas.

Entre estos, se destaca uno desarrollado por Bocchini y Angeletti en 1969 [17], que permite obtener NGF en su forma 2.5S con un rendimiento considerable y con una composición de cadenas A y B casi equitativa. Otro método de purificación de NGF 2.5S que se ha desarrollado es el de Mobley et al. de 1975 [39], que consigue un porcentaje de cadenas B de 35%, menor al de Bocchini y Angeletti. Para purificar al NGF en su forma B₂ y con un porcentaje de cadenas A menor al 10%, Jeng y Bradshaw desarrollaron otro método en 1978 [40].

Un protocolo relevante para este trabajo fue el desarrollado por Varon *et al.* en 1967 [13], que consigue purificar al NGF en forma de complejo 7S, a partir del cual se puede purificar la subunidad β en sus diferentes proteoformas. Este protocolo fue modificado en 1977 por Stach *et al.* [41], quienes no solo lograron reducir el tiempo de purificación en 10 veces, sino que también consiguieron aumentar el rendimiento en un factor de dos. Este protocolo involucra la realización de un homogeneizado que se fracciona mediante exclusión molecular, colectando la fracción correspondiente al peso molecular del complejo NGF 7S. Luego se realiza una cromatografía de intercambio aniónico y finalmente una segunda exclusión molecular.

A partir del complejo NGF 7S es posible purificar la subunidad β en su forma A_2 , como lo publicaron Varon *et al.* en 1972 [42], mediante una cromatografía de intercambio catiónico, basándose en la diferencia de puntos isoeléctricos de las subunidades α , β y γ , siendo la subunidad β básica (pI 9.3, [43]) y las otras dos ácidas (pI 4.3 y 5.5, respectivamente, [44]). El rendimiento de este paso de purificación sería prácticamente total.

Los diferentes protocolos, los rendimientos de purificación, la composición de cadenas A y B del NGF purificado y el grado de proteólisis del aminoácido C-terminal arginina se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Protocolos de purificación. Resumen los protocolos, sus rendimientos, proteoformas de NGF y sus características.

	NGF 7S		β NGF	NGF 2.5S		NGF
Estructura	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$		β_2	β_2		β_2
Subunidad β	A_2		A_2	AB		B_2
Protocolos de purificación	Varon <i>et al.</i> (1967)	Stach <i>et al.</i> (1977)	Varon <i>et al.</i> (1972)	Bocchini y Angeletti (1969)	Mobley <i>et al.</i> (1976)	Jeng y Bradshaw (1978)
Rendimiento	15-35 mg/100 glándulas	35-40 mg/100 glándulas	20% de masa proteica (NGF 7S)	19 mg/ 80-100 g de glándulas	19 mg/ 80-100 g de glándulas	27-33 mg/ 100 g de glándulas
% Cadenas A	-	-	92	-	55	<10
% Cadenas B	-	-	8	-	45	>90
% Des-Arg	-	-	8	-	16	15

En este sentido, se destaca la necesidad de actualización y optimización de los protocolos con el objetivo de conseguir esta proteína en cantidades y pureza suficientes para llevar a cabo su estudio.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Purificar la proteína factor de crecimiento nervioso a partir de glándulas submaxilares de ratón en su forma biológicamente activa.

3.2. Objetivos específicos

1. Poner a punto métodos cromatográficos para la purificación del factor de crecimiento nervioso.
2. Evaluar su actividad biológica.

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

Los reactivos cloruro de sodio (NaCl), fosfato de sodio monobásico y dibásico (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4), tris(hidroximetil)aminometano (Tris-base), hidrocloreto de tris (Tris-HCl), acetato de sodio (NaAc), hidróxido de sodio (NaOH), azida de sodio (NaN_3), cloruro de zinc (ZnCl_2), medio RPMI 1640, suero bovino fetal (FBS) y suero equino (HS) fueron adquiridos en Sigma. El ácido clorhídrico (HCl) fue adquirido en Mallinckrodt, el ácido acético (HAc) en J.T. Baker. Las glándulas submaxilares de ratones macho y las células PC12 fueron cedidas por Emiliano Trías del laboratorio de Neurodegeneración del Instituto Pasteur de Montevideo.

Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua ultrapura desionizada (resistividad 18.2 M Ω .cm, Barnstead GenPure Ultrapure Water Purification System, Thermo Scientific).

4.2. Métodos

4.2.1. Empaquetado de columnas de exclusión molecular

4.2.1.1. Sephacryl S-200

Para la preparación de la columna de exclusión molecular Sephacryl S-200 se utilizó una columna de borosilicato de dimensiones 4.8 cm de diámetro interno y 60 cm de largo (Sigma, juntas de politetrafluoroetileno, sin camisa) con la re-

sina Sephacryl S-200 Superfine (Pharmacia Fine Chemicals). Previamente se lavó un volumen de 1.085 L de resina Sephacryl S-200 con agua ultrapura que se llevó a una concentración del 50% y se desgaseó en vacío sin agitación. Se adjuntaron otras dos columnas de borosilicato de dimensiones 4.8 cm de diámetro interno y 30 cm de largo (Sigma) a modo de reservorio y se vertió la suspensión de resina dejando eluir el solvente hasta la estabilización del frente de la resina. Se removieron las columnas antes adjuntas y se procedió al empaquetado de la columna con el equivalente a un volumen de columna de agua ultrapura a un flujo de 5 mL/min en un equipo HPLC Gilson UV/Vis-155.

Para la calibración de la columna se corrió una mezcla estándar de 4 proteínas (Xantina Oxidasa 270 kDa, Inmunoglobulina G 150 kDa, Albúmina sérica bovina 67 kDa y Citocromo c 12.4 kDa, Sigma), tras el equilibrado de la columna con 2 volúmenes de amortiguador de corrida (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaN₃ 0.02%). La mezcla de proteínas se preparó en un volumen de 20 mL de amortiguador de corrida y se inyectó en la columna de forma manual. Se corrió la columna con amortiguador de corrida a un flujo de 3 mL/min registrando la absorbancia a 280 nm.

4.2.1.2. Sephacryl S-100

Para la preparación de la columna de exclusión molecular Sephacryl S-100 se utilizó una columna de borosilicato de dimensiones 2.6 cm de diámetro interno y 60 cm de largo (Sigma, juntas de politetrafluoroetileno, sin camisa) con la resina Sephacryl S-100 High Resolution (Pharmacia Biotech).

Para el empaquetado se procedió de igual forma que con la columna de Sephacryl S-200 con la diferencia de que se realizó a un flujo de 2 mL/min. La calibración de la columna se realizó corriendo una mezcla estándar de 4 proteínas (Alcohol deshidrogenasa 141 kDa, Albúmina sérica bovina 67 kDa, Anhidrasa carbónica 29 kDa y Citocromo c: 12.4 kDa, Sigma) luego de equilibrar la columna con 2 volúmenes de amortiguador de corrida (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM). La mezcla estándar se preparó en un volumen de 1 mL de amortiguador de corrida y se sembró de forma manual. Se corrió la columna con amortiguador de corrida a un flujo de 2 mL/min registrando la absorbancia a 280 nm.

4.2.2. Purificación de NGF

4.2.2.1. Homogeneizado

Se pesaron y contaron entre 6-8 g de glándulas submaxilares de ratones macho adultos. En una placa de Petri sobre hielo se eliminó el tejido conjuntivo y adiposo y se cortaron en trozos pequeños con ayuda de un bisturí. Las glándulas, junto a 3 mL/g de glándulas de amortiguador de lisis frío (fosfato de sodio 10 mM, pH 6.8, 10 uM ZnCl₂, cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA, Thermo Scientific™), fueron procesadas en hielo durante 90 segundos con un homogeneizador Polytron PT 10-35 710W (Kinematica) y durante 60 segundos con un homogeneizador Potter.

El homogeneizado se ultracentrifugó a 4°C de temperatura durante 45 minutos a una velocidad de 50.000xg (Ultracentrífuga Sorvall™ MTX 150 Series, rotor S-58 A, Thermo Scientific™). El sobrenadante obtenido se filtró a través de lana de vidrio, se desgaseó en vacío y se mantuvo en hielo hasta el momento de la exclusión molecular.

4.2.2.2. Exclusión molecular 1

La columna de exclusión molecular S-200 fue equilibrada con 2 volúmenes de amortiguador de corrida (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaN₃ 0.02%) a un flujo de 3 mL/min. El homogeneizado de glándulas submaxilares (22 mL) fue sembrado de forma manual en la columna, tras lo cual se comenzó la corrida a un flujo de 3 mL/min en un equipo HPLC Gilson UV/Vis-155. Durante la corrida se registró la absorbancia a 280 nm y se colectaron distintas fracciones que se mantuvieron en hielo hasta su análisis y utilización.

4.2.2.3. Cromatografía de intercambio catiónico

Para el intercambio catiónico se utilizó una columna de matriz poliestireno divinilbenceno con grupos sulfopropil como fase estacionaria (POROS™ GoPure™ 1.2 cm x 5 cm, Thermo Scientific™) de dimensiones 1.2 cm de diámetro interno y 5 cm de largo, estable y con carga negativa en un rango de pH de 2-14.

La fracción obtenida de la exclusión molecular se dializó dos veces contra 5 L de diferentes amortiguadores (acetato de sodio 50 mM, pH 4.0 o acetato de sodio 50 mM, pH 5.0) o se llevó a pH final de 8.3 (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3) con perlas de hidróxido de sodio. Se descartó la mayor parte del precipitado posible y se centrifugó la muestra a 4°C de temperatura durante 15 minutos a una velocidad de 10.000xg (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific™)

La columna se equilibró en el mismo amortiguador que la muestra a separar y se sembró la muestra de forma manual. La corrida se realizó a un flujo de 3 mL/min en un equipo HPLC Gilson UV/Vis-155, durante la cual se registró la absorbancia a 280 nm y se colectaron la fracción no unida y los diferentes picos observados en el cromatograma, correspondientes al lavado y elución de la columna, que se mantuvieron en hielo hasta su uso.

Las soluciones utilizadas para el equilibrado, lavado y elución de las corridas fueron distintas a cada uno de los pH ensayados. Las mismas se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Soluciones utilizadas durante la cromatografía de intercambio catiónico.

	pH 4.0	pH 5.0	pH 8.3
Equilibrado	NaAc 50 mM, pH 4.0	NaAc 50 mM pH 5.0	Tris-HCl 50 mM pH 8.3
Lavado	NaAc 50 mM, pH 4.0, gradiente lineal de NaCl (0-0.4 M) NaAc 50 mM, pH 4.0, NaCl 0.4 M, gradiente lineal de NaCl (0.4-1 M)	NaAc 50 mM pH 5.0, NaCl 0.24 M	Tris-HCl 50 mM, pH 8.3
Elución	NaAc 50 mM, pH 4.0, NaCl 1 M	NaAc 50 mM pH 5.0, NaCl 1 M	Tris-HCl 50 mM, pH 8.3, gradiente lineal de NaCl (0-0.5 M) Tris-HCl 50 mM, pH 8.3, salto de NaCl 1 M

4.2.2.4. Exclusión molecular 2

Las muestras fueron concentradas hasta un volumen mínimo de 5 mL y sembradas en la columna de exclusión molecular S-100, previamente equilibrada con dos volúmenes de amortiguador de corrida (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM) a un flujo de 2 mL/min en un equipo HPLC Gilson UV/Vis-155. Durante la corrida se registró la absorbancia a 280 nm.

4.2.2.5. Diálisis y almacenamiento

Se dializaron las muestras de NGF dos veces contra 5 L de amortiguador acetato de sodio 5 mM, pH 5.0. Se cuantificaron las muestras por absorbancia a 280 nm y se alicuotaron de a 0.5 y 5 mL para luego ser liofilizadas y almacenadas a -10 °C hasta su uso.

4.2.3. Análisis de las muestras y caracterización bioquímica

4.2.3.1. SDS-PAGE

El análisis electroforético de las distintas fracciones se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, con duodecilsulfato de sodio (SDS) en amortiguador de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3, 0.1% SDS). El preparado de las muestras se realizó luego de haberlas desalado, diluyendo las mismas en amortiguador de carga (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, 2.5% SDS, 0.002% azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol, 10% glicerol) e incubándolas a 100 °C durante 10 minutos. Para los geles revelados con las distintas tinciones se utilizó un marcador de peso molecular no teñido (New England BioLabs, #P7712S; 11-245 kDa) mientras que para los que se analizaron mediante western blot se utilizó uno pre-teñido (New England BioLabs, #P7704S; 10-200 kDa). Las corridas electroforéticas se realizaron a 120 V a temperatura ambiente. Para el revelado se utilizó tinción con el colorante catiónico Coomassie (0.05% azul de coomassie G-250 en 45% alcohol metílico, 10% ácido acético) o tinción de plata (ProteoSilver™ Silver Stain Kit, Sigma), según se aclare.

Los geles fueron escaneados en los equipos Li-Cor Odyssey 9120 o Gel Doc™ EZ System, BioRad, según las configuraciones recomendadas.

4.2.3.2. Western blot

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante transferencia semi-seca (Hoefer™ TE 70, 1 mA/cm², 90 minutos). Se verificó la correcta transferencia mediante tinción con el colorante Rojo Ponceau y se lavó la membrana con agua ultrapura.

La membrana fue bloqueada sumergiéndola en solución de bloqueo (amortiguador fosfato salino, 3% leche descremada) durante 60 minutos a temperatu-

ra ambiente. Se realizaron 3 lavados con solución de lavado (amortiguador fosfato salino, Tween 0.1%) durante 5 minutos.

La incubación con el anticuerpo primario anti-NGF (Abcam a6198, dilución 1/500, amortiguador fosfato salino, BSA 3%, NaN₃ 0.05%) se realizó a 4°C durante 12-16 horas con agitación. Se lavó la membrana 3 veces con solución de lavado durante 5 minutos. Se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado al fluorocromo IRDye 800CW (Li-cor 926-32211, dilución 1/10000, amortiguador fosfato salino, NaN₃ 0.05%) a temperatura ambiente durante 60 minutos con agitación.

Tras otros 3 lavados durante 5 minutos, se escaneó la membrana en el equipo Li-Cor Odyssey 9120 a las longitudes de onda 685 nm y 785 nm.

4.2.4. Ensayo de actividad NGF

Se utilizaron células PC12, una línea celular establecida derivada de un feocromocitoma de médula suprarrenal de rata. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 10% HS y 5% FBS sobre botellas tratadas con colágeno como sustrato (colágeno de cola de rata tipo I 0.1 mg/mL, ácido acético 0.02%, incubación a 37°C durante 2 hs y 2 lavados con agua ultrapura estéril). Los cambios de medio se realizaron cada 3 días descartando 2/3 del mismo y reemplazándolo por medio fresco. Las células se repicaron cada 7 días levantándolas mediante raspado.

Para el ensayo de actividad se plaquearon 8000 células/cm² de superficie previamente tratada con solución de colágeno (colágeno de cola de rata tipo I 0.33 mg/mL, ácido acético 0.02%, incubación a 37°C durante 2 hs y 2 lavados con agua ultrapura estéril), en medio RPMI 1640 10% HS y 5% FBS. A las 24 horas se lavaron las células adheridas con amortiguador fosfato salino y se trataron con concentraciones crecientes de NGF purificado (0, 20, 200 ng/mL) en medio RPMI 1640 deprivado de suero, por duplicado. Se evaluó la diferenciación celular luego de transcurridos 6 días de tratamiento a través de la observación de la morfología celular mediante microscopía de campo claro.

5. Resultados y discusión

En este trabajo se realizó la purificación de NGF empleando un protocolo que integra los aportes de los trabajos de Varon *et al.* (1967 y 1972) [13, 42] y Stach *et al.* (1977) [41]. Se realizaron algunas modificaciones pertinentes que se describirán en cada apartado correspondiente.

La estrategia utilizada y los pasos implicados en la purificación de NGF se resumen en la Figura 6.

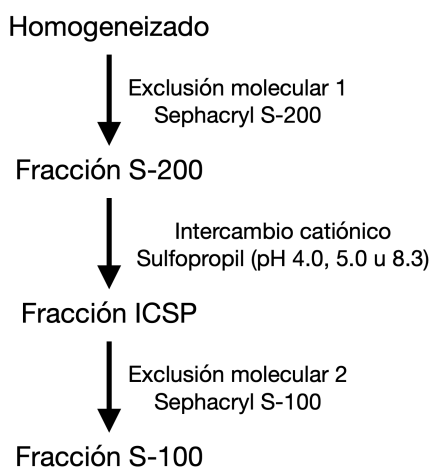


Figura 6. Esquema de purificación del factor de crecimiento nervioso.

5.1. Empaquetado de columnas de exclusión molecular

En este primer paso de fraccionamiento, una modificación del método original que se incluyó fue las dimensiones de la columna Sephacryl S-200, particularmente del largo. Esto no debería afectar la resolución de la misma siempre y cuando se respete el límite de volumen de muestra a sembrar, siendo el 4% del volumen total de la columna la cota superior (43.4 mL para la columna Sephacryl S-200 48/60).

Como se puede observar en ambos cromatogramas obtenidos durante las corridas de calibración (Figura 7), ambas columnas resolvieron la mezcla de proteínas sembrada en sus respectivos componentes. Las corridas transcurrieron sin que ocurra un aumento considerable de la presión, mostrando un correcto empaquetado de la resina. Los picos obtenidos fueron discretos, confirmando lo mencionado anteriormente y evidenciando la capacidad de resolución de ambas columnas. La simetría de los picos está en concordancia con los ran-

gos de resolución de las dos resinas (Sephacryl S-200: 5-120 kDa, Sephacryl S-100: 1-100 kDa), ya que todas las proteínas ingresan a la matriz, no observándose frentes ni colas alargadas.

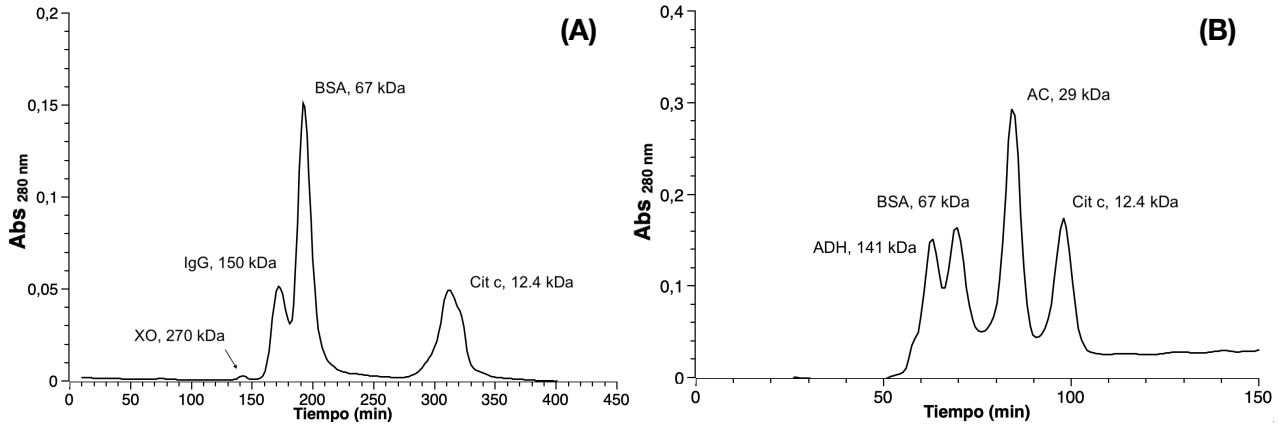


Figura 7. Cromatogramas de calibración de las columnas de exclusión molecular. Columnas Sephacryl S-200 (A) y Sephacryl S-100 (B). Absorbancia a 280 nm en función del tiempo de elución. Estándares proteicos: (A) Xantina oxidasa (XO), Inmunoglobulina G (IgG), Albúmina sérica bovina (BSA) y Citocromo c (Cit c), (B) Alcohol deshidrogenasa (ADH), BSA, Anhidrasa carbónica (AC), Cit c.

En la Figura 8 se grafica la masa molecular de las proteínas estándar en función de sus tiempos de elución, éstos últimos fueron tomados del valor en el eje de abscisas correspondiente al máximo de cada pico. En escala logarítmica esta dependencia es lineal y obedece a la ecuación 1, donde MM se corresponde con la masa molecular, t con tiempo de elución y a y b son los parámetros de la recta.

$$\log (MM) = a . t + b \quad \text{Ec.1.}$$

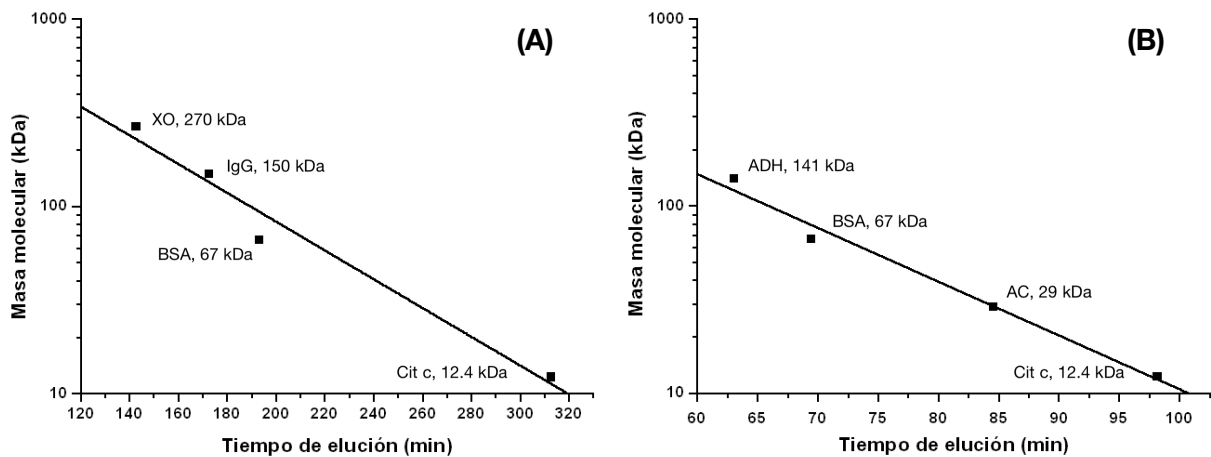


Figura 8. Calibración de las columnas de exclusión molecular. Columnas Sephacryl S-200 (A) y Sephacryl S-100 (B). Curva de calibración de la masa molecular en función del tiempo de elución. Estándares proteicos: (A) Xantina oxidasa (XO), Inmunoglobulina G (IgG), Albúmina sérica bovina (BSA) y Citocromo c (Cit c), (B) Alcohol deshidrogenasa (ADH), BSA, Anhidrasa carbónica (AC), Cit c.

Mediante el ajuste lineal de estos valores, cuyos parámetros se presentan en la Tabla 3, se comprobó la capacidad separativa de la columna así como también su correcta calibración.

Tabla 3. Parámetros del ajuste lineal a la Ec. 1. Se muestran la pendiente (a), ordenada en el origen (b) y coeficiente de determinación (R^2) de las curvas de calibración de las columnas de exclusión molecular.

	a	b	R^2
Sephacryl S-200	-0.018 ± 0.002	7.9 ± 0.5	0.97
Sephacryl S-100	-0.066 ± 0.006	$9.0 \pm 0,5$	0.98

Este ajuste fue importante ya que permitió estimar el tiempo de elución del complejo NGF 7S, el cual tiene un peso molecular de 130 kDa, en la primer exclusión molecular, siendo éste de 175 minutos aproximadamente (Sephacryl S-200 48/60, 3 mL/min). Junto a los tiempos de elución reportados en la bibliografía sobre purificación de NGF, el tiempo de elución estimado permitió determinar los límites de la fracción a colectar durante la primer exclusión molecular.

Lo mismo se consideró para la elución del NGF 2.5S, el cual tiene un peso molecular de 26.5 kDa, en la segunda exclusión molecular. El tiempo de elución calculado para el dímero fue de 86 minutos aproximadamente (Sephacryl S-100 26/60, 2 mL/min).

5.2. Purificación de NGF

5.2.1. Homogeneizado

En la Figura 9 se muestran las glándulas submaxilares luego de haber eliminado el tejido adiposo y conjuntivo.

Una modificación de este etapa fue incluir Zn^{2+} en el amortiguador de lisis, que estabiliza el complejo NGF 7S y de esta forma evita tanto la disociación del complejo y consecuente disminución en el rendimiento, como el clivaje del octapéptido amino terminal, ya que se ha demostrado que el holocomplejo

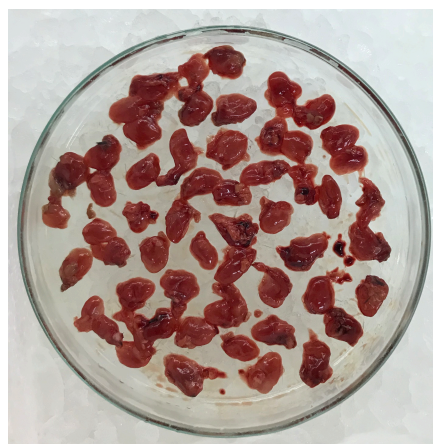


Figura 9. Glándulas submaxilares de ratones macho.

protege a la subunidad β de sufrir proteólisis limitada [24, 25]. Con este mismo objetivo, se incluyó un cóctel inhibitor de proteasas que inactiva a las enzimas responsables del clivaje del octapéptido N-terminal, disminuyendo el porcentaje de cadenas B en el NGF obtenido. Se cuidó que el mismo no tuviera EDTA ya que este compuesto es capaz de quelar metales divalentes como el Zn^{2+} , resultando en la desestabilización del complejo NGF 7S.

5.2.2. Exclusión molecular 1

El fraccionamiento mediante exclusión molecular del extracto acuoso de glándulas submaxilares de ratones macho adultos (homogeneizado) resolvió la muestra sembrada, obteniéndose un perfil de elución (Figura 10) muy similar al esperado según los trabajos de Varon *et al.* (1967 y 1972) [13, 42] y Stach *et al.* (1977) [41].

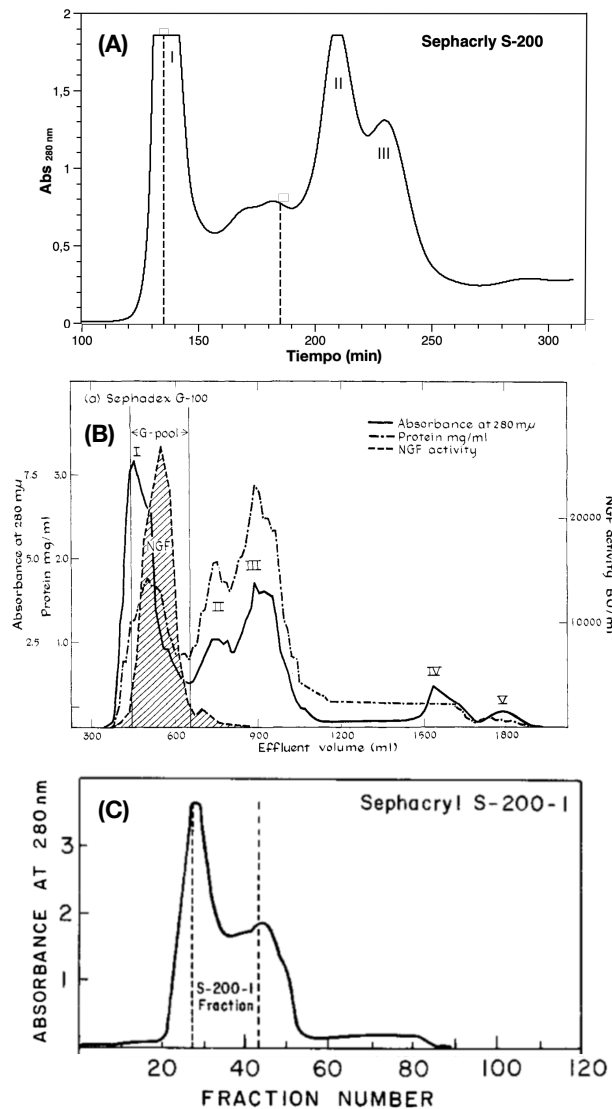


Figura 10. Cromatogramas del primer paso de fraccionamiento mediante exclusión molecular. (A) Cromatograma obtenido del fraccionamiento en la columna Sephacryl S-200 48/60. **(B)** Cromatograma obtenido según Varon *et al* 1967 [13], columna Sephadex G-100 40/125 **(C)** Cromatograma obtenido según Stach *et al* 1977 [41], columna Sephacryl S-200 50/100.

Como se puede observar, los perfiles de elución son similares, y están caracterizados por un gran pico inicial (I), en el cual eluyen lipoproteínas, proteínas plasmáticas y ácidos nucleicos, un segundo pico (II) correspondiente con la hemoglobina y finalmente un tercer pico (III). En los cromatogramas registrados durante este trabajo, el primer pico no se llega a ver de forma completa al saturarse la señal del detector pero su turbidez característica sirvió como insumo para definir la fracción a colectar. La única diferencia que se observa entre los cromatogramas registrados y los esperados es la mayor absorbancia del segundo pico, debido a una mayor concentración de hemoglobina en el homogeneizado, atribuible al método de extracción y procesamiento de las glándulas. De todas formas, esta mínima diferencia no impidió la recolección de la fracción ya que la misma se hizo entre el máximo del primer pico hasta el comienzo de la elución de la hemoglobina, siempre correspondiéndose con tiempos de elución entre 135-185 minutos, aproximadamente.

El análisis de las fracciones colectadas mediante SDS-PAGE (Figura 11) permitió comprobar la importancia de este paso de purificación en el cual se obtiene una fracción enriquecida en NGF y se consigue eliminar una gran cantidad de proteínas contaminantes, principalmente hemoglobina (principal banda de los carriles 6 y 7), proteínas plasmáticas (carril 2) y otras del tejido glandular.

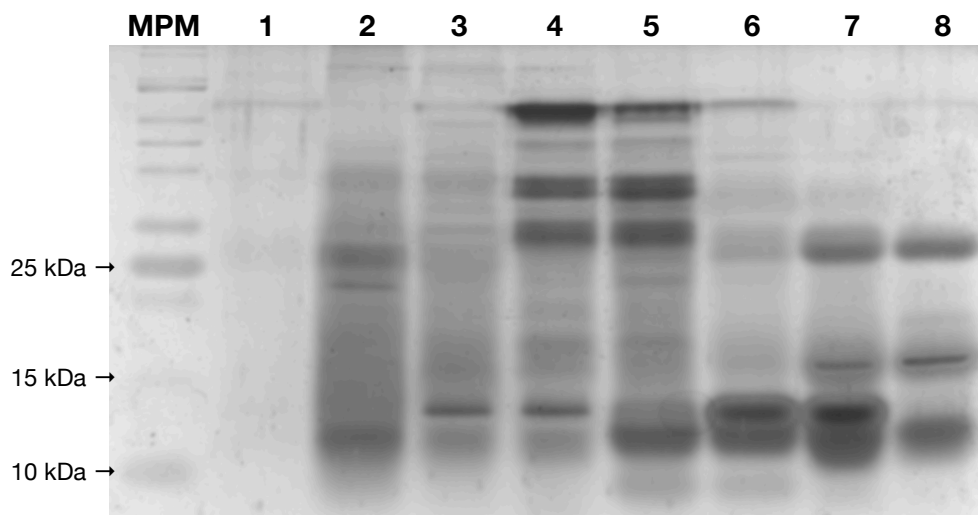


Figura 11. SDS-PAGE de las fracciones de la primer exclusión molecular. Tinción de plata. Carriles: **MPM.** Marcador de peso molecular. **1.** 114-135 min. **2.** S-200: 135-152 min. **3.** S-200: 152-169 min. **4.** S-200: 169-185 min **5.** 185-194 min. **6.** 194-212 min. **7.** 212-232 min **8.** 232-248 min.

El análisis por western blot de las fracciones obtenidas presentado en la Figura 12 mostró bandas correspondientes con el peso molecular del monómero de

NGF 2.5S, de 13 kDa aproximadamente, en los carriles 2, 3 y 4, correspondientes con la fracción S-200 colectada.

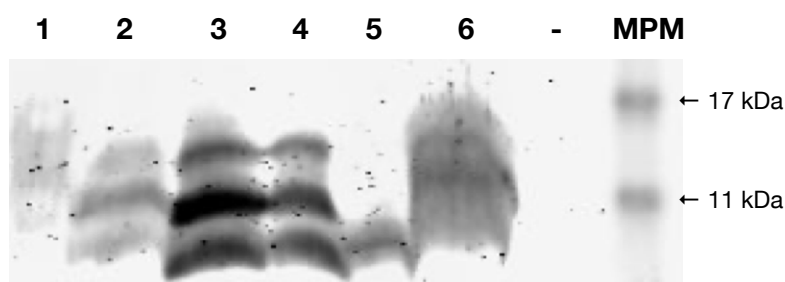


Figura 12. Western blot anti-NGF de las fracciones obtenidas de la primer exclusión molecular. Carriles: **1.** 114-135 min. **2.** S-200: 135-152 min. **3.** S-200: 152-169 min. **4.** S-200: 169-185 min **5.** 185-194 min. **6.** Fracción S-200. **MPM.** Marcador de peso molecular.

Esta observación sirvió para verificar los tiempos de elución elegidos como límites de la fracción a recolectar. Antes de los 135 min y luego de los 185 min no se observa señal para NGF.

Si bien se esperaba una única banda en el western blot, en el mismo se observan tres. En principio, esto podría deberse a diferentes grados de proteólisis del monómero de NGF 2.5S, tanto del octapéptido amino terminal como del residuo de arginina carboxilo terminal, o bien a diferentes estados de reducción de los tres enlaces disulfuro internos.

Debido a la dificultad de la medición de la actividad NGF no es posible determinar un factor de purificación para esta etapa. De manera alternativa, se evalúa la masa proteica (valores recuperados en la Tabla 4), observándose una eliminación de más del 90% de proteínas contaminantes sin aparente pérdida de NGF en las fracciones descartadas, al menos detectable por la técnica western blot.

El siguiente paso consistía en una cromatografía de intercambio aniónico, la cual fue omitida ya que requería flujos de corrida mayores a 5 mL/min, difíciles de alcanzar con los equipos disponibles. De todas formas, este paso se ha demostrado que no es crucial para la obtención de NGF de alta pureza por trabajos en los que se omite como el de Bocchini y Angeletti de 1969 [17]. Lo mismo se consideró a la hora de omitir la segunda gel filtración ya que el objetivo del trabajo de Varon *et al.* de 1967 era la purificación del complejo 7S [13].

5.2.3. Cromatografía de intercambio catiónico

Para la realización de esta cromatografía se sustituyó la resina original carboximetilcelulosa por una con grupos sulfopropil, de química similar pero con la ventaja de mantener su carga negativa en un rango mayor de pH así como también de mayor capacidad de carga en términos de masa de proteína por volumen de resina.

Este segundo paso de purificación se aprovecha de la alta basicidad del NGF 2.5S, cuyo punto isoeléctrico es de 9.3, en comparación con las otras subunidades del complejo NGF 7S y el resto de proteínas. En este sentido, es necesaria la disociación del complejo de forma previa a la realización de la cromatografía de intercambio catiónico, la cual ocurre a valores de pH menores a 5 y mayores a 8 unidades [45].

La cromatografía de intercambio catiónico a pH 4.0 permitió obtener una fracción enriquecida en NGF (Fracción ICSP) así como también disminuir la concentración de proteínas contaminantes. El equilibrado de la fracción S-200 en el amortiguador de corrida, realizado mediante diálisis, resultó en la precipitación de gran cantidad de proteínas debido al bajo pH.

En el cromatograma de la Figura 13 se muestra el perfil de elución obtenido para esta cromatografía a pH 4.0. En el mismo se observa que el paso de lavado eluye una cantidad significativa de proteínas contaminantes y que la elución debido al gradiente lineal de fuerza iónica da lugar a tres picos distinguibles (I, II y III).

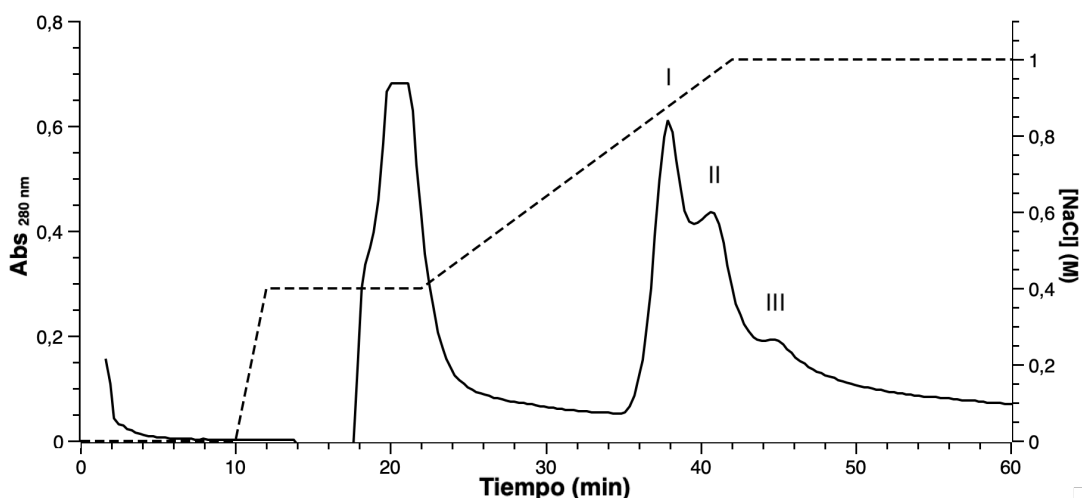


Figura 13. Cromatograma de la cromatografía de intercambio catiónico a pH 4.0. Absorbancia a 280 nm (—) y concentración de NaCl (---) en función del tiempo de elución.

El análisis de las fracciones colectadas mediante SDS-PAGE (Figura 14) mostró una gran heterogeneidad proteica en los picos recolectados (carriles 6-8), y que en la fracción no unida (carril 4) eluye una cantidad mínima de las proteínas sembradas (carril 3), debido a que la gran mayoría logra interactuar con la columna.

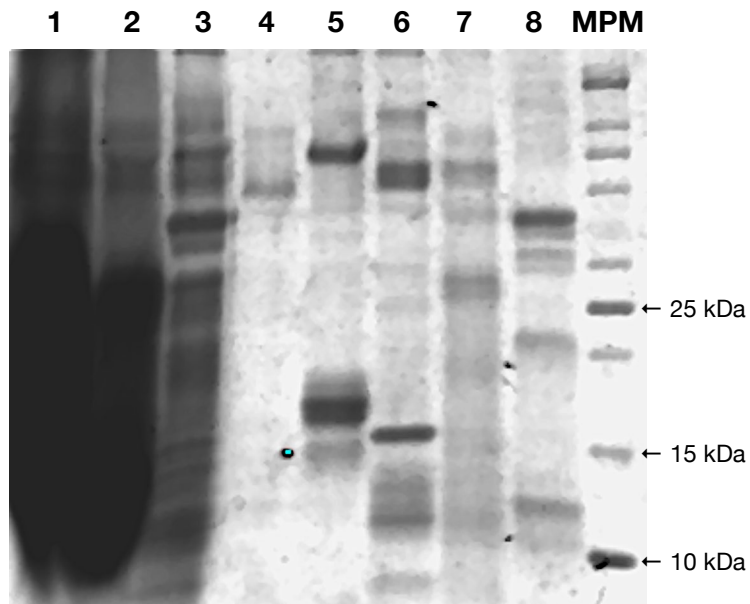


Figura 14. SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de intercambio catiónico a pH 4.0. Tinción Coomassie. Carriles: **1.** Homogeneizado. **2.** Precipitado. **3.** Fracción S-200. **4.** Fracción no unida. **5.** Lavado. **6.** Pico I. **7.** Pico II. **8.** Pico III. **MPM.** Marcador de peso molecular.

Mediante el análisis por western blot (Figura 15) se determinó la presencia de una banda a la altura de los 13 kDa en el carril 6, mostrando que el NGF 2.5S eluye en el primer pico (I). Además, se observó la presencia de NGF en el pico II con la particularidad de que la banda se ubicó a una altura correspondiente con una masa molecular de 26 kDa, en concordancia con la del dímero de NGF 2.5S, el cual tiene un peso molecular de 26.5 kDa.

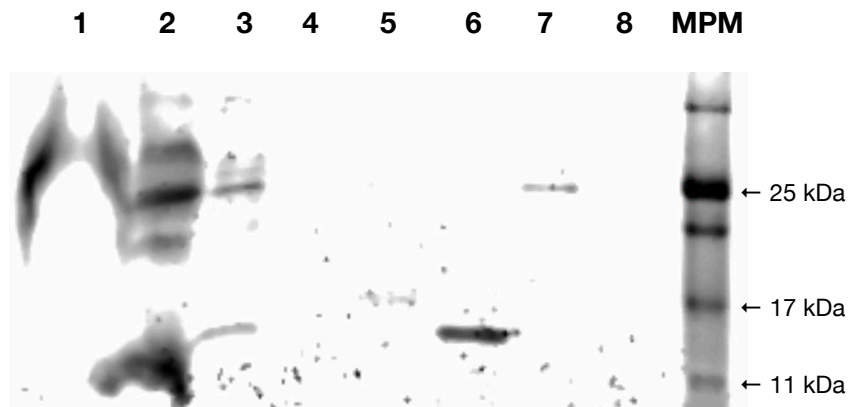


Figura 15. Western blot anti-NGF de las fracciones de la cromatografía de intercambio catiónico a pH 4.0. Carriles: **1.** Homogeneizado. **2.** Precipitado. **3.** Fracción S-200. **4.** Fracción no unida. **5.** Lavado. **6.** Pico I. **7.** Pico II. **8.** Pico III. **MPM.** Marcador de peso molecular.

Esto podría atribuirse al solapamiento de los picos colectados, aunque esto no explicaría porqué se observan en distinto grado de agregación.

Una observación relevante para este trabajo es la presencia de una intensa señal para NGF en el carril correspondiente con el precipitado, producto de la diálisis, tanto a la altura correspondiente con el monómero como a la de dímero. Esto evidencia que una importante cantidad de NGF 2.5S precipita debido al cambio de pH, seguramente debido a la cercanía del pH final con los puntos isoeléctricos de las subunidades α y γ , de 4.3 y 5.5, respectivamente.

Considerando estas observaciones, se realizó la cromatografía de intercambio catiónico a pH 5.0, siendo este un pH al cual se espera que el complejo 7S se encuentre dissociado y se podría ver disminuida la precipitación proteica.

El cromatograma obtenido de la realización de la cromatografía de intercambio catiónico a pH 5.0 se presenta en la Figura 16. El perfil de elución fue similar al del trabajo de Bocchini y Angeletti [17], por lo que se esperaba que el NGF 2.5S eluyera en el pico V.

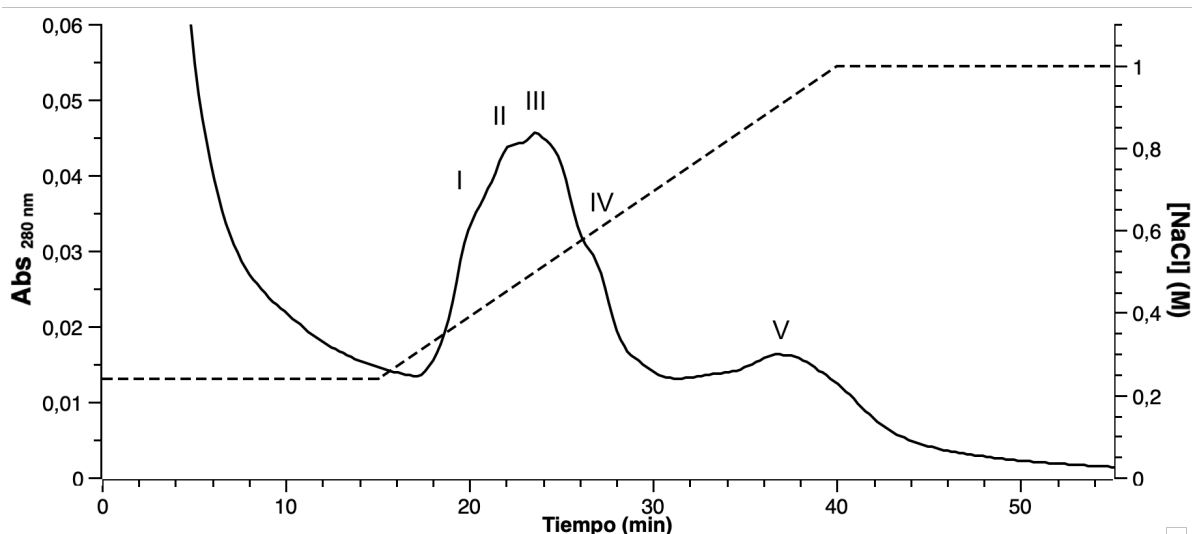


Figura 16. Cromatograma de la cromatografía de intercambio catiónico a pH 5.0. Absorbancia a 280 nm (—) y concentración de NaCl (---) en función del tiempo de elución.

El análisis de las diferentes fracciones mediante SDS-PAGE (Figura 17) mostró la baja concentración de proteínas en las fracciones colectadas, en concordancia con los bajos valores de absorbancia registrados en el cromatograma,

así como también la ausencia de proteínas, al menos detectable por tinción de plata, en el pico V (carril 7).

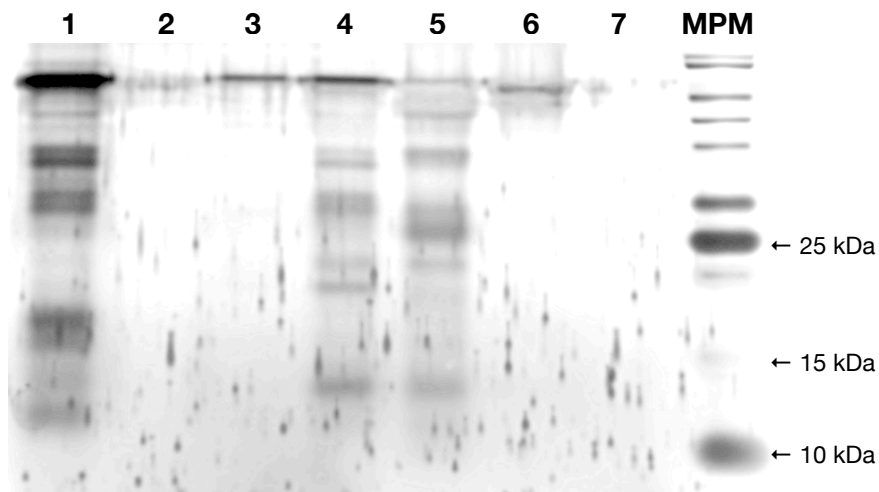


Figura 17. SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de intercambio catiónico a pH 5.0. Tinción de plata. Carriles: **1.** Fracción S-200. **2.** Fracción no unida **3.** Pico I. **4.** Pico II. **5.** Pico III. **6.** Pico IV. **7.** Pico V. **MPM.** Marcador de peso molecular.

El análisis mediante western blot (no mostrado) de estas fracciones comprobó la observación anterior ya que no se detectó la presencia de NGF en ninguna de las fracciones. Probablemente, y como también se observó en el caso de pH 4.0, el NGF 2.5S precipita junto a alguna de las subunidades α o γ debido al cambio de pH, y por lo tanto no llega a observarse en ninguna de las fracciones ni tampoco en la muestra sembrada en la columna.

Una observación que se repite en ambas cromatografías realizadas a pH 4.0 y 5.0 es que la fracción no unida no contiene prácticamente proteínas. Esto indica que a estos valores de pH la gran mayoría de proteínas se encuentran cargadas positivamente por tener un punto isoeléctrico mayor al pH de la solución e interaccionan con la matriz cargada negativamente.

En el análisis del proteoma murino de la Figura 18 se pudo confirmar esta observación ya que las proteínas con puntos isoeléctricos mayores a 4.0 y 5.0 representan el 99.1% y el 87.2% del proteoma, respectivamente [46]. Con esta premisa, y para el caso de una cromatografía de intercambio catiónico, las condiciones óptimas para eliminar la mayor cantidad de proteínas contaminantes implican realizar la corrida a un valor de pH lo más elevado posible, cuidando mantener a la proteína de interés con carga positiva.

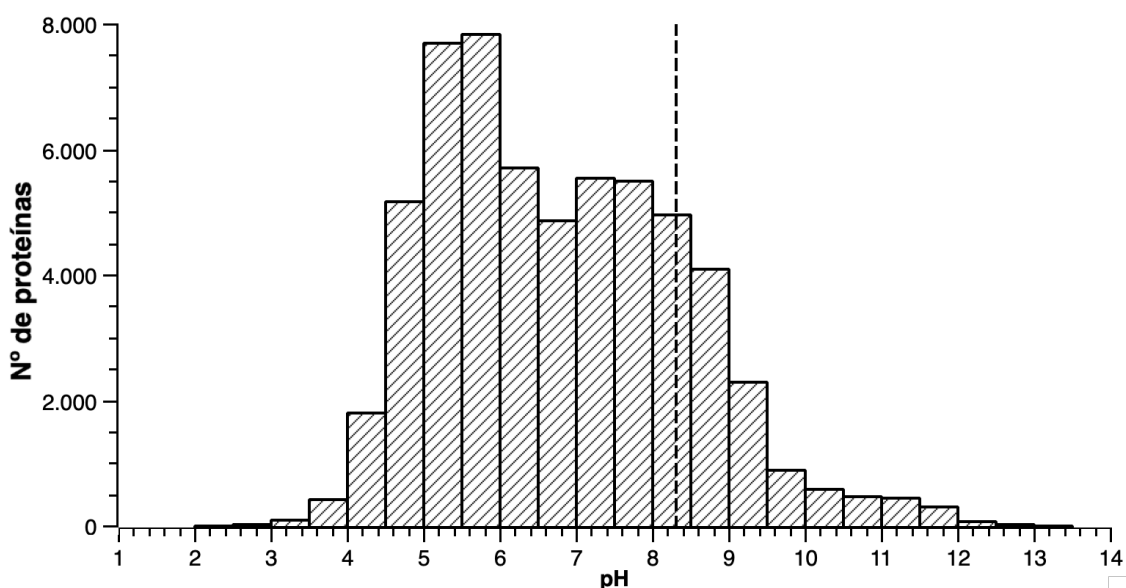


Figura 18. Histograma de la distribución de puntos isoeléctricos en el proteoma murino. La línea punteada indica el valor de pH 8.3. La información utilizada para realizar este gráfico fue extraída de [46].

En base a estas observaciones, se realizó la cromatografía de intercambio catiónico a un pH más básico, cuidando mantenerse una unidad por debajo del punto isoeléctrico del NGF 2.5S, de forma de asegurar que la proteína se encuentre con carga neta positiva y de esta forma interactúe con los grupos sulfopropil de la fase estacionaria. Además, debido a que el complejo 7S se encuentra disociado a valores de pH mayores a 8.0, un valor de 8.3 resulta acertado. De esta forma, las proteínas con punto isoeléctrico menor a 8.3, que representan entorno a un 80.9% del proteoma murino, se encontrarán con carga neta negativa y eluirán de la columna en la fracción no unida.

La cromatografía de intercambio catiónico a pH 8.3 permitió obtener una fracción enriquecida en NGF (Fracción ICSP). Una observación a destacar es que durante el equilibrado de la fracción S-200 en el pH de la corrida la cantidad de proteínas que precipitó fue mínima en comparación con lo observado a pH 4.0 y 5.0.

En el perfil de elución del cromatograma obtenido presentado en la Figura 19 se pueden distinguir cinco picos, cuatro (I - IV) que aparecen durante el establecimiento del gradiente de fuerza iónica y un último pico (V) producto del salto final.

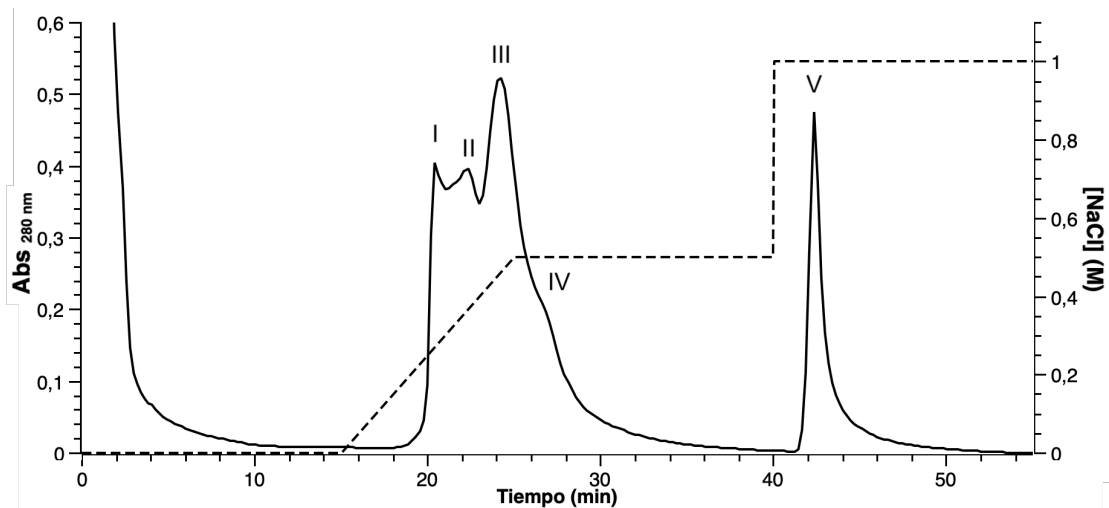


Figura 19. Cromatograma de la cromatografía de intercambio catiónico a pH 8.3. Absorbancia a 280 nm (—) y concentración de NaCl (---) en función del tiempo de elución.

El análisis de los diferentes picos mediante SDS-PAGE se muestra en la Figura 20. Comparando la muestra sembrada y la fracción no unida se verifica que la mayor parte de las proteínas se encuentran cargadas negativamente y eluyen sin interactuar con la columna, favoreciendo la purificación.

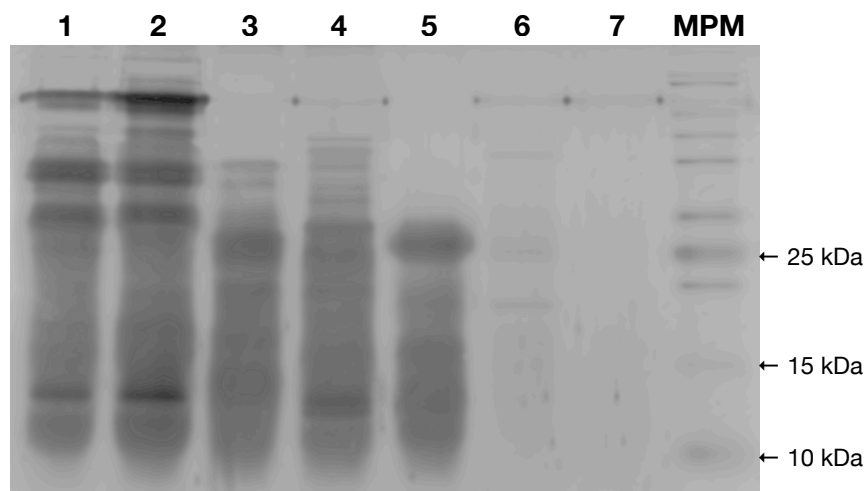


Figura 20. SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de intercambio catiónico a pH 8.3. Tinción de plata. Carriles: 1. Fracción S-200. 2. Fracción no unida 3. Pico I. 4. Pico II. 5. Pico III. 6. Pico IV. 7. Pico V. **MPM.** Marcador de peso molecular.

Mediante western blot (Figura 25) se determinó que el NGF eluye en el pico III, cuando se alcanza una concentración de NaCl de 0.24 M. La banda se identificó como dímero probablemente debido a que la concentración de la proteína durante la cromatografía favorece la dimerización y dificulta su desnaturalización.

5.2.4. Exclusión molecular 2

El fraccionamiento de las muestras obtenidas de las cromatografías de intercambio catiónico a pH 4.0 y 8.3 mediante exclusión molecular permitió remover algunas proteínas contaminantes y obtener una fracción más enriquecida en NGF (Fracción S-100).

El cromatograma obtenido del fraccionamiento para la muestra purificada a pH 4.0 se presenta en la Figura 21.

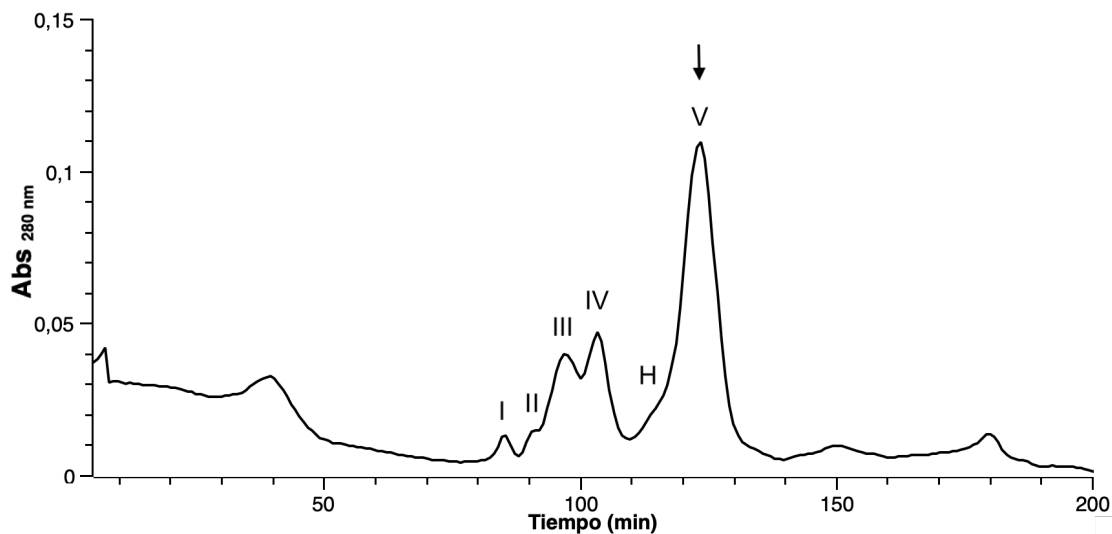


Figura 21. Cromatogramas del segundo paso de fraccionamiento mediante exclusión molecular. Correspondiente a la muestra obtenida por cromatografía de intercambio catiónico a pH 4.0. Absorbancia a 280 nm en función del tiempo de elución. Con la flecha (\downarrow) se indica el pico en el cual eluye el NGF.

En el mismo se observa la aparición de varios picos, de entre los cuales el NGF eluye en el señalado con una flecha, correspondiente con un tiempo de elución de 123.4 min, significativamente mayor al esperado para el dímero (86 min). Probablemente, el NGF esté en su forma monomérica debido a la baja concentración a la que se encuentra.

El análisis de los picos obtenidos mediante SDS-PAGE presentado en la Figura 22 permitió determinar que el NGF eluye en el pico V y evidencia la utilidad de la exclusión molecular como paso final de purificación. La realización del mismo permitió eliminar las proteínas contaminantes de mayor peso molecular, que eluyen de forma más temprana, principalmente en los picos III y IV (carriles 4 y 5).

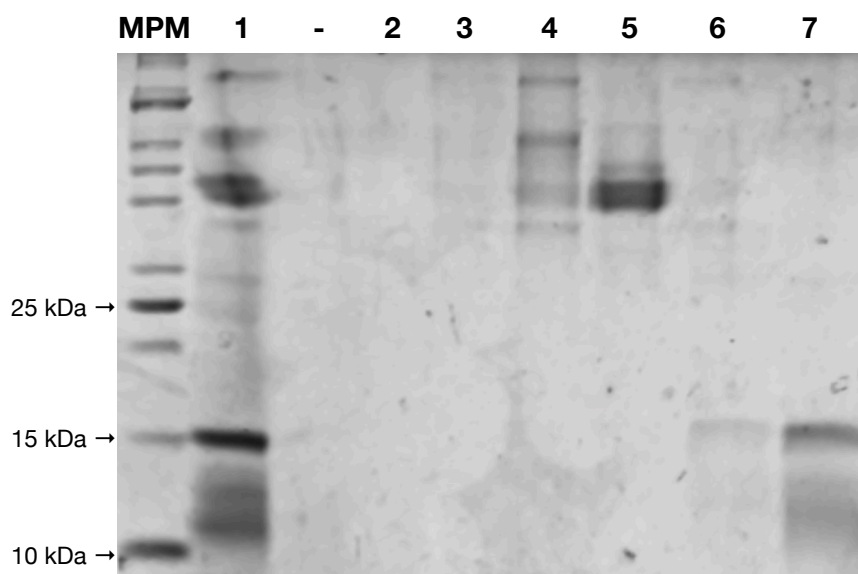


Figura 22. SDS-PAGE de las fracciones de la segunda exclusión molecular. Tinción coomasie. Correspondiente a la muestra obtenida por cromatografía de intercambio catiónico a pH 4.0. Carriles: **MPM.** Marcador de peso molecular. **1.** Muestra sembrada. **2.** Pico I. **3.** Pico II. **4.** Pico III **5.** Pico IV **6.** Hombro **7.** Pico V

En cuanto a la exclusión molecular de la muestra obtenida a pH 8.3, el cromatograma obtenido se muestra en la Figura 23. En el mismo se observan tres picos principales del los cuales el tercero, señalado con una flecha, se corresponde con el NGF 2.5S. El tiempo de elución fue de 97.4 min, algo mayor que el esperado para el dímero pero significativamente menor que el tiempo de elución del NGF en la exclusión molecular de la muestra obtenida a pH 4.0, sugiriendo que la proteína se encuentra en su forma dimérica.

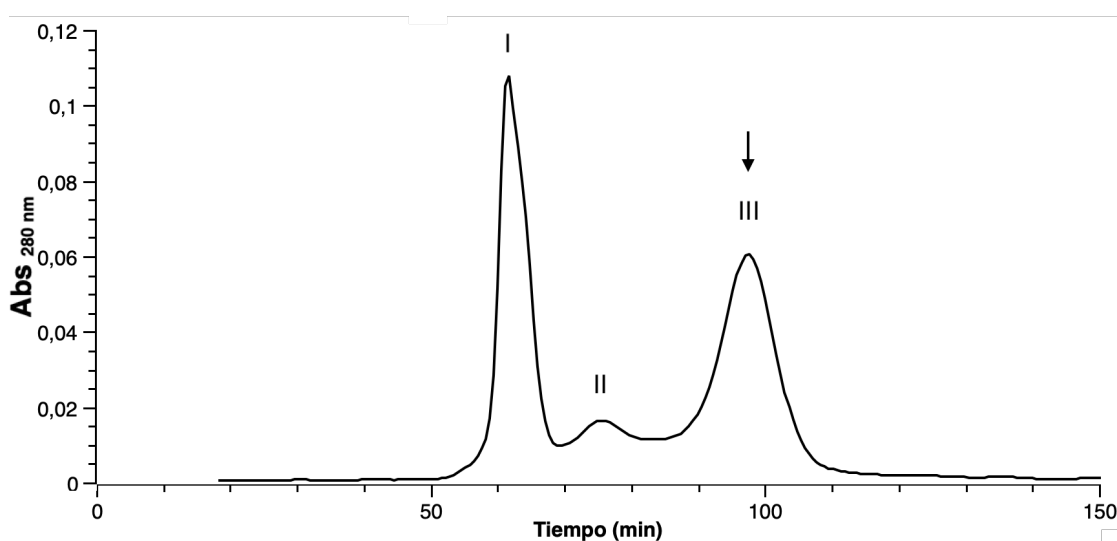


Figura 23. Cromatogramas del segundo paso de fraccionamiento mediante exclusión molecular. Correspondiente a la muestra obtenida por cromatografía de intercambio catiónico a pH 8.3. Absorbancia a 280 nm en función del tiempo de elución. Con la flecha (↓) se indica el pico en el cual eluye el NGF.

El análisis de estas fracciones mediante SDS-PAGE (Figura 24) permitió determinar que en este caso la exclusión molecular elimina algunas proteínas de mayor peso molecular pero que las mismas no representan una contaminación mayor.

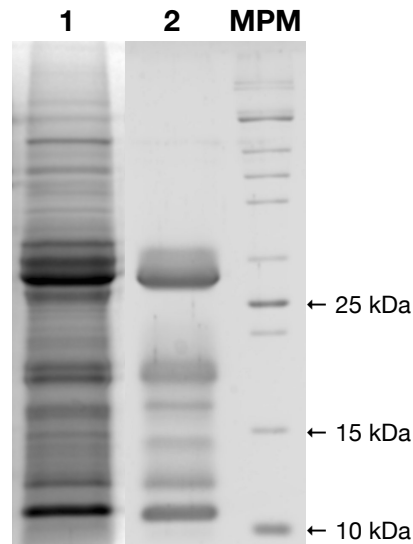


Figura 24. SDS-PAGE de las fracciones de la segunda exclusión molecular. Tinción coomasie. Correspondiente a la muestra obtenida por cromatografía de intercambio catiónico a pH 8.3. Carriles: **MPM**. Marcador de peso molecular. **1**. Muestra sembrada. **2**. Pico III.

Mediante western blot (Figura 25), se confirmó que el NGF 2.5S eluye en el pico III y que lo hace en forma de dímero, observándose una banda a la altura de 26 kDa, en concordancia con la observación anterior sobre los tiempos de elución.

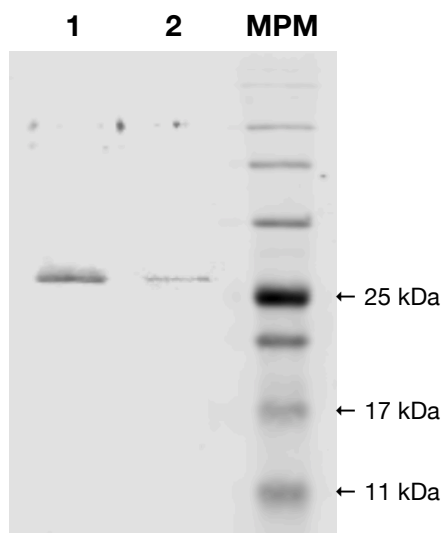


Figura 25. Western blot anti-NGF de las muestras obtenidas de la exclusión molecular. Correspondiente a la muestra obtenida por cromatografía de intercambio catiónico a pH 8.3. Carriles: **1**. Muestra sembrada. **2**. Pico III. **MPM**. Marcador de peso molecular.

5.2.5. Evaluación de los pasos de purificación y rendimiento

Evaluando el grado de recuperación de proteínas en cada una de las etapas se puede determinar en qué paso ocurre la mayor purificación. Nuevamente, debido a la dificultad de determinación de la actividad NGF en términos cuantitativos no es posible determinar un factor de purificación pero ignorando posibles pérdidas de actividad se puede considerar una magnitud equivalente.

Como se observa en la Tabla 4, la primer exclusión molecular elimina aproximadamente un 90% de las proteínas contaminantes. Las diferencias ente los distintos valores de pH se deben al equilibrado de cada fracción en el pH correspondiente, pudiendo observarse que la precipitación de proteínas es mayor a pH 4.0 que a pH 5.0, mientras que a pH 8.3 es mínima.

En cuanto a la cromatografía de intercambio catiónico, en ambos casos (pH 4.0 y 8.3) se reducen las proteínas contaminantes en otro 90% aunque cabe destacar que en el último caso el NGF representa una mayor proporción de las proteínas presentes en la muestra por lo que sin tener valores de actividad no es posible comparar objetivamente ambas condiciones.

Finalmente, la segunda exclusión molecular elimina las proteínas contaminantes en un un 36% en el caso de la muestra a pH 4.0, y en un 72% en el caso de la muestra a pH 8.3. Esto resulta factible como último paso de purificación pero la utilidad del mismo también debería ser evaluada en términos de actividad siendo que el NGF es una proteína lábil en solución.

Tabla 4. Resumen de la purificación de NGF. En la tabla se presentan el volumen (Vol), la concentración proteica ([C], determinada por el método del ácido bicinonínico), y la masa proteica de cada una de las fracciones.

	pH 4.0				pH 5.0				pH 8.3			
	Vol (mL)	[C] (mg/mL)	Proteína Total (mg) %		Vol (mL)	[C] (mg/mL)	Proteína Total (mg) %		Vol (mL)	[C] (mg/mL)	Proteína Total (mg) %	
Homogeneizado	22	35.0	770	100	22	34.6	761	100	22	34.6	761	100
Fracción S-200	141	0.40	56.4	7.3	147	0.53	77.9	10.2	147	0.58	85.3	11.2
Fracción ICSP	24	0.14	3.4	0.44	-	-	-	-	14.4	0.56	8.06	1.1
Fracción S-100	66	0.033	2.18	0.28	-	-	-	-	45	0.05	2.25	0.30

Analizando mediante SDS-PAGE (Figura 26) la muestra obtenida a pH 8.3 a lo largo del proceso de purificación se evidenció cómo se eliminan las proteínas contaminantes hasta obtener una fracción en la cual el NGF es la proteína mayoritaria, representando un 34% de las proteínas presentes, según se pudo determinar por cuantificación de bandas utilizando el software ImageJ.

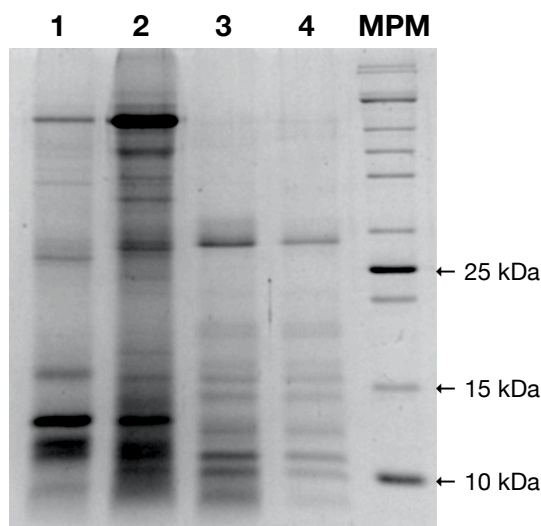


Figura 26. SDS-PAGE de las fracciones a lo largo del proceso de purificación. Tinción coomasie. Correspondiente a la muestras obtenidas a pH 8.3. Carriles: **1.** Homogeneizado. **2.** Fracción S-200. **3.** Fracción ICSP. **4.** Fracción S-100. **MPM.** Marcador de peso molecular.

Si bien se obtuvo una fracción enriquecida en NGF tanto a pH 4.0 como a pH 8.3, ésta última resultó ser la mejor alternativa en términos de rendimiento y pureza. El análisis de ambas fracciones mediante SDS-PAGE permitió determinar que en la obtenida a pH 8.3 el NGF es la proteína mayoritaria mientras que en la obtenida a pH 4.0 la contaminación por otras proteínas es mayor.

El rendimiento estimado de NGF para la purificación realizada a pH 8.3 fue de 11 mg de proteína cada 100 gramos de glándulas submaxilares de ratones macho adultos. Si bien es menor, este valor es comparable con el reportado por diferentes métodos (Tabla 1), siendo que el tejido fresco siempre presenta variabilidad y más en este caso donde la expresión del NGF varía de forma considerable según la edad de extracción [11].

El rendimiento de NGF calculado para la fracción obtenida a pH 4.0 fue considerablemente más bajo, de 0.7 mg cada 100 gramos de glándulas, atribuible a la gran precipitación observada en el equilibrado de la fracción al pH correspondiente y a la detección de NGF mediante western blot en el precipitado.

5.3. Ensayo de actividad NGF

Las células PC12 crecieron correctamente en las condiciones descritas en materiales y métodos. Tras 6 días de incubación con la fracción enriquecida en NGF obtenida a pH 8.3 se evidenció el efecto de actividad tipo-NGF sobre las células PC12. En la Figura 27 se presentan los resultados morfológicos del tratamiento.

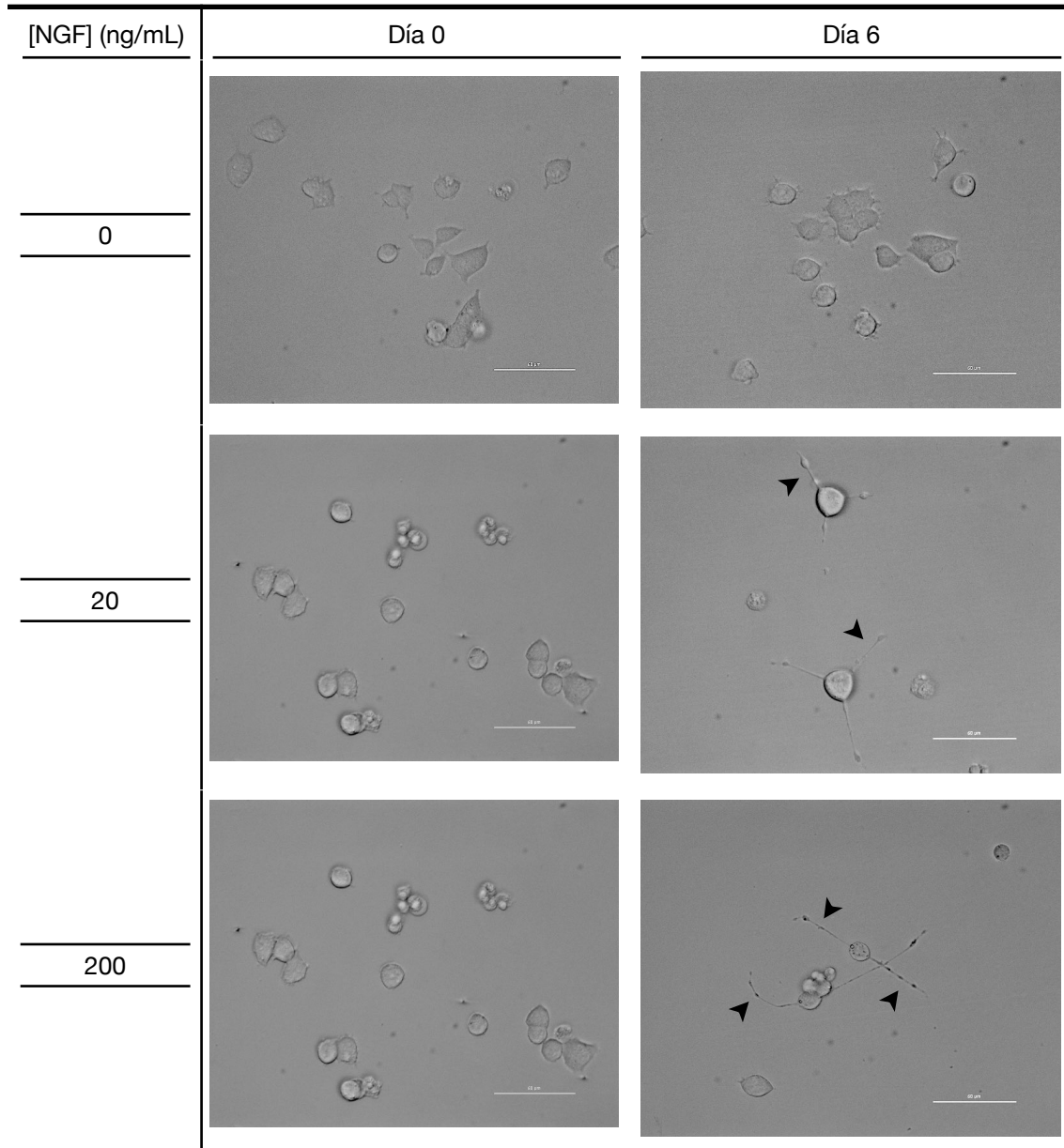


Figura 27. Ensayo de actividad NGF. Morfología de células de feocromocitoma de médula suprarrenal de rata (PC12) bajo microscopía de campo claro a 0 y 6 días de tratamiento con factor de crecimiento nervioso (0, 20 y 200 ng/mL). Con las flechas (►) se señalan las proyecciones neuronales. Barra de escala: 60 μ m.

Antes del mismo, las células tienen una morfología poligonal propia de esta línea celular cuando se encuentra adherida a su sustrato. Transcurridos los 6 días en medio RPMI sin suero, las células control presentaron una morfología algo más esférica y se observó una menor adherencia, probablemente debido a muerte celular inducida por la privación de suero y ausencia de soporte trófico. Contrariamente, las células tratadas tanto con 20 ng/mL como con 200 ng/mL de NGF mantuvieron su adherencia en el tiempo del ensayo y en las mismas se observó la aparición de proyecciones neuronales, señaladas con flechas en la Figura 27, características de la diferenciación de estas células en un fenotipo neuronal.

Cabe destacar que en las células control no se observó en ningún caso el desarrollo de estas proyecciones celulares, lo cual permite la atribución de este efecto al tratamiento con NGF.

Estos resultados permiten afirmar que el NGF obtenido a pH 8.3 se encuentra en su forma biológicamente activa, y que, por lo tanto, la proteína no pierde su actividad durante el proceso de purificación.

6. Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica de los métodos disponibles para la purificación del factor de crecimiento nervioso a partir de glándulas submaxilares de ratones macho adultos. Este tejido tiene la ventaja de ser fácilmente obtenible, siendo que la proteína protagonista de este trabajo tiene un costo elevado y su expresión recombinante se ha demostrado dificultosa hasta el momento. Las diferentes estrategias de purificación existentes hasta la fecha fueron evaluadas, adaptadas y actualizadas a los materiales y equipos disponibles, llegándose a un protocolo que fue evaluado factible, optimizando tiempos y reactivos.

En este sentido, se logró el empaquetado y calibración de columnas de exclusión molecular que fueron necesarias para el protocolo de purificación.

En relación a los objetivos propuestos, se logró obtener una fracción enriquecida en NGF con un rendimiento de 11 mg de NGF/100 g de glándulas, comparable con los de la bibliografía existente. La fracción se identificó mediante ensayos inmuno-específicos y se evaluó en términos de actividad biológica, comprobándose que el NGF purificado no pierde su actividad durante el protocolo de purificación y se encuentra en su forma biológicamente activa, capaz de promover la diferenciación de células PC12.

La línea de trabajo del factor de crecimiento nervioso será continuada en el marco de un proyecto de maestría en el que se estudiarán las modificaciones oxidativas postraduccionales mediadas por peroxinitrito y otros oxidantes. Por esto, se requiere la obtención de NGF en cantidades y pureza considerables.

Como aspectos a mejorar del protocolo, se podría evaluar la realización de una cromatografía de intercambio catiónico, de forma posterior al primer paso de exclusión molecular, que consiga unir a las proteínas con carga positiva que luego podrían contaminar la muestra e interferir en la cromatografía de intercambio catiónico ya ensayada. El NGF, al encontrarse en su forma de complejo 7S tendría carga neta negativa y eluiría en la fracción no unida. Luego de favorecer la disociación del complejo se realizaría la cromatografía de intercambio catiónico.

Este paso podría ser mejorado si se realizara la corrida a un pH de 9.0, en el cual el NGF 2.5S aún mantendría su carga positiva y se evitaría la interacción de proteínas cuyos puntos isoeléctricos se encuentren entre 8.3 y 9.0. Así, se conseguiría evitar la unión del 91.4% del proteoma murino, pudiéndose obtener un 10.5% de contaminación menos que a pH 8.3.

Financiación

Se agradece al Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, CSIC-grupos y Espacio Interdisciplinario por la financiación de este proyecto.

7. Referencias bibliográficas

- [1]. Skaper, S. D. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008. 7(1):46-62.
- [2]. Robinson, R. C., Radziejewski, C., Stuart, D. I., Jones, E. Y. Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry*. 1995. 34(13):4139-4146.
- [3]. Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., Lindholm, D. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J*. 1990. 9(11):3545-3550.
- [4]. Poo, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*. 2001. 2(1):24-32.
- [5]. Thoenen, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 1995. 270(5236):593-598.
- [6]. Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool*. 1951. 116(2):321-361.
- [7]. Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology*. 1953. 123(2):233-287.
- [8]. Levi-Montalcini, R., Meyer, H., Hamburger, V. In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res*. 1954. 14(1):49-57.
- [9]. Cohen, S., Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcomas 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1954. 40(10):1014-1018.
- [10]. Cohen, S., Levi-Montalcini, R. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Snake Venom. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1956. 42(9):571-574.
- [11]. Cohen, S. Purification of a Nerve-Growth Promoting Protein from the Mouse Salivary Gland and Its Neuro-Cytotoxic Antiserum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1960. 46(3):302-311.

- [12]. Marx, J. L. The 1986 Nobel Prize for physiology or medicine. *Science*. 1986. 234(4776):543-544.
- [13]. Varon, S., Nomura, J., Shooter, E. M. The isolation of the mouse nerve growth factor protein in a high molecular weight form. *Biochemistry*. 1967. 6(7):2202-2209.
- [14]. Angeletti, R. H., Bradshaw, R. A. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971. 68(10):2417-2420.
- [15]. Taiwo, Y. O., Levine, J. D., Burch, R. M., Woo, J. E., Mobley, W. C. Hyperalgesia induced in the rat by the amino-terminal octapeptide of nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991. 88(12):5144-5148.
- [16]. Moore, J. B., Jr., Mobley, W. C., Shooter, E. M. Proteolytic modification of the beta nerve growth factor protein. *Biochemistry*. 1974. 13(4):833-840.
- [17]. Bocchini, V., Angeletti, P. U. The nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular-weight protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969. 64(2):787-794.
- [18]. Watson, A. Y., Anderson, J. K., Siminoski, K., Mole, J. E., Murphy, R. A. Cellular and subcellular colocalization of nerve growth factor and epidermal growth factor in mouse submandibular glands. *Anat Rec*. 1985. 213(3):365-376.
- [19]. Murphy, R. A., Chlumecky, V., Smillie, L. B., Carpenter, M., Nattriss, M., Anderson, J. K., et al. Isolation and characterization of a glycosylated form of beta nerve growth factor in mouse submandibular glands. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989. 264:12502 - 12509.
- [20]. McDonald, N. Q., Lapatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A., Blundell, T. L. New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature*. 1991. 354(6352):411-414.
- [21]. Williams, R., Gaber, B., Gunning, J. Raman spectroscopic determination of the secondary structure of crystalline nerve growth factor. *J Biol Chem*. 1982. 257(22):13321-13323.

- [22]. Varon, S., Nomura, J., Shooter, E. M. Subunit structure of a high-molecular-weight form of the nerve growth factor from mouse submaxillary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967. 57(6):1782-1789.
- [23]. Bradshaw, R. A., Murray-Rust, J., Ibanez, C. F., McDonald, N. Q., Lapatto, R., Blundell, T. L. Nerve growth factor: structure/function relationships. *Protein Sci*. 1994. 3(11):1901-1913.
- [24]. Pattison, S. E., Dunn, M. F. On the relationship of zinc ion to the structure and function of the 7S nerve growth factor protein. *Biochemistry*. 1975. 14(12):2733-2739.
- [25]. Pattison, S. E., Dunn, M. F. On the mechanism of divalent metal ion chelator induced activation of the 7S nerve growth factor esterase. Thermodynamics and kinetics of activation. *Biochemistry*. 1976. 15(17):3696-3703.
- [26]. Cuello, A. C., Pentz, R., Hall, H. The Brain NGF Metabolic Pathway in Health and in Alzheimer's Pathology. *Front Neurosci*. 2019. 13:62.
- [27]. Fahnstock, M., Michalski, B., Xu, B., Coughlin, M. D. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci*. 2001. 18(2):210-220.
- [28]. Sofroniew, M. V., Howe, C. L., Mobley, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*. 2001. 24:1217-1281.
- [29]. Nykjaer, A., Willnow, T. E., Petersen, C. M. p75^{NTR} - live or let die. *Curr Opin Neurobiol*. 2005. 15(1):49-57.
- [30]. Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004. 427(6977):843-848.
- [31]. Kim, M. J., Vargas, M. R., Harlan, B. A., Killoy, K. M., Ball, L. E., Comte-Walters, S., et al. Nitration and Glycation Turn Mature NGF into a Toxic Factor for Motor Neurons: A Role for p75^(NTR) and RAGE Signaling in ALS. *Antioxid Redox Signal*. 2018. 28(18):1587-1602.
- [32]. Organization, W. H. Global action plan on the public health response to dementia 2017 - 2025. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services; 2017.

- [33]. Salehi, A., Delcroix, J. D., Swaab, D. F. Alzheimer's disease and NGF signaling. *J Neural Transm (Vienna)*. 2004. 111(3):323-345.
- [34]. Williams, B. J., Eriksson-Jonhagen, M., Granholm, A. C. Nerve growth factor in treatment and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2006. 80(3):114-128.
- [35]. Pehar, M., Vargas, M. R., Cassina, P., Barbeito, A. G., Beckman, J. S., Barbeito, L. Complexity of astrocyte-motor neuron interactions in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis*. 2005. 2(3-4):139-146.
- [36]. Pehar, M., Vargas, M. R., Robinson, K. M., Cassina, P., England, P., Beckman, J. S., et al. Peroxynitrite transforms nerve growth factor into an apoptotic factor for motor neurons. *Free Radic Biol Med*. 2006. 41(11):1632-1644.
- [37]. Bruno, M. A., Leon, W. C., Fragoso, G., Mushynski, W. E., Almazan, G., Cuervo, A. C. Amyloid beta-induced nerve growth factor dysmetabolism in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009. 68(8):857-869.
- [38]. Aloe, L., Rocco, M. L., Balzamino, B. O., Micera, A. Nerve growth factor: role in growth, differentiation and controlling cancer cell development. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016. 35(1):116.
- [39]. Mobley, W. C., Schenker, A., Shooter, E. M. Characterization and isolation of proteolytically modified nerve growth factor. *Biochemistry*. 1976. 15(25):5543-5552.
- [40]. Jeng, I., Bradshaw, R. A. The Preparation of Nerve Growth Factor. In: Marks N, Rodnight R, editors. *Research Methods in Neurochemistry: Volume 4*. Boston, MA: Springer US; 1978. p. 265-288.
- [41]. Stach, R. W., Wagner, B. J., Stach, B. M. A more rapid method for the isolation of the 7S nerve growth factor complex. *Analytical Biochemistry*. 1977. 83(1):26-32.
- [42]. Varon, S., Nomura, J., Perez-Polo, J. R., & Shooter, E. M. The isolation and assay of the nerve growth factor proteins. *Methods and Techniques of Neurosciences*. 1972. 3:203-209.
- [43]. Bocchini, V. The nerve growth factor. Amino acid composition and physicochemical properties. *Eur J Biochem*. 1970. 15(1):127-131.

[44]. Varon, S., Shooter, E. M. The Nerve Growth Factor Proteins of the Mouse Submaxillary Gland. In: Bowman R.E. DSP, editor. *Biochemistry of Brain and Behavior*: Springer; 1970. p. 41-64.

[45]. Smith, A. P., Varon, S., Shooter, E. M. Multiple forms of the nerve growth factor protein and its subunits. *Biochemistry*. 1968. 7(9):3259-3268.

[46]. Kozlowski, L. P. Proteome-pl: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res*. 2017. 45(D1):D1112-D1116.