



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

BO 1398/98
Ej. 2

ESCUELA NACIONAL
DE ESTUDIOS
PROFESIONALES
CAMPUS IZTACALA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL
TÍTULO DE

BIOLOGO

EMPLEO DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES PARA LA
DETERMINACION DE LA
PROTEINA C-REACTIVA

Presenta

José Ayala Dávila

1998

Los Reyes Iztacala
Estado De México

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo* se realizó en el laboratorio 26 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. José Manuel Hernández Hernández

* Apoyado por el Proyecto CONACyT 0613-M-910

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi asesor, Dr. José Manuel Hernández Hernández, por haberme apoyado y brindado sus conocimientos; así como tiempo y paciencia para el término de este trabajo.

Hago patente mis agradecimientos a los sinodales del presente trabajo, Dra. Leticia Moreno Fierros, M. en C. Martha Salcedo Alvarez, M. en C. Ramón V. Moreno y Biol. David González Pantaleon por los comentarios realizados y atinadas sugerencias al presente trabajo.

Agradezco la ayuda y amistad que me brindaron mis compañeros del laboratorio 26 en el Departamento de Biología Celular, durante la realización de esta tesis: Judith Valdes , Rosa María García, Carlos Cortés, Carlos García, Rafael Cortés, Rebeca Cedeño, Fortunato Mote, en especial al Biólogo Armando Pérez Rangel y al Lic. Armando Sanchez por su desinteresada colaboración.

A la Sra. Ma. Esther Cid por su excelente asistencia secretarial.

A los integrantes del Laboratorio 2 en el Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV, por su apoyo y comprensión.

A mis amigos y compañeros: Biólogo Emelia Campoy Otero, Biólogo Juan Carlos Estrada Mora y Biólogo Mario Gil Moreno Pérez por su amistad incondicional y sincera.

DEDICATORIA

Con cariño y respeto a mis Padres:

Angel Ayala Morales y Margarita Dávila Orozco por
todo lo que significan para mi.

A mis hermanos:

Francisco Javier, Armando, Angel,
María Luisa, Guillermo, Noelia Margarita, María Cristina y Alejandra por todos
todos los momentos que hemos vivido.

A mis sobrinos:

Brisa, Lluvia, Pamela, Kimberly, Stephany,
Nadia, Angel, Mar, Christian, Fernanda , Michel , Omar Guillermo y
Cassandra, por su alegría.

A toda mi familia.

Don't believe in excess

Success is to give

Don't believe in riches

But you should see where I live

I...I believe in love

Words: Bono / Music: U2

INDICE

INDICE	I
ABREVIATURAS	III
RELACION DE FIGURAS Y TABLAS	IV
RESUMEN	V
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	14
METODOLOGÍA	
1.- CULTIVO DE CELULAS DE MIELOMA	15
2.- INMUNIZACION DE ANIMALES	15
3.- CUANTIFICACION DE PROTEINAS	16
4.- PREPARACION DE HIBRIDOMAS	16
5.- ELECTROFORESIS	17
6.- ELISA	18
7.- PRODUCCION DE LIQUIDO ASCITICO ANTI-CRP	19
8.- CARACTERIZACION DE ANTI-CRP	19
9.- PURIFICACION DE IgG DE LÍQUIDO ASCÍTICO	20
10.- BIOTINILIZACION DE ANTICUERPOS ANTI-CRP PURIFICADOS	20
11.- INMUNOTRANSFERENCIA	20
12.- ENSAYO INMUNOENZIMATICO PARA DETERMINAR NIVELES DE CRP	22

RESULTADOS	
ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-CRP	23
FUSION Y CLONACION	25
PRODUCCIÓN DE LIQUIDO ASCITICO	27
RENDIMIENTO DE LIQUIDO ASCITICO	28
CUANTIFICACION DE CRP EN SUEROS INFECTADOS	28
DISCUSION	32
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFIA	35

RELACION DE ABREVIATURAS

CRPh	Proteína C-reactiva de humano
SAP	Componente P de suero Amiloide
mAb	Anticuerpo monoclonal
α CRP	Anti-Proteína C-reactiva de humano
PMN	Polimorfonuclear
MAC	Complejo de ataque a membrana
IL	Interleucina
Pch	Fosfocolina
PnC	Polisacárido C de <i>neumococco</i>
K_d	Constante de disociación
LPC	Lisofosfatidilcolina
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Fn	Fibronectina
C'	Complemento
Igs	Inmunoglobulinas
IgG	Inmunoglobulina de clase G
SFB	Suero fetal bovino
μ g	microgramo
ml	mililitro
CO ₂	Bióxido de carbono
i.p.	intraperitoneal
ELISA	<i>ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>
nm	nanómetro
BSA	Albúmina sérica bovina
HAT	Hipoxantina-Aminopterina-Timidina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
r.p.m.	revoluciones por minuto
mAmp	miliampere

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

- Figura 1. Título de anticuerpos policlonales anti-CRP.
- Figura 2. Selección de Híbridos resistentes a HAT.
- Figura 3. Dot blot de clonas seleccionadas.
- Figura 4. Inmunoblot para detección de CRP de humano.
- Figura 5. Título de Líquido Ascítico anti-CRP IgG1K.
- Figura 6. Curva estándar de CRP.
- Figura 7. Niveles basales de CRP.
- Figura 8. Anticuerpos anti-*S. aureus*.
- Figura 9. Cambios en la concentración sérica de la proteína C-reactiva en ratones Balb/c infectados con la bacteria *Staphylococcus aureus* Cowan I.

Tablas

- Tabla 1.- Proteínas con sitios homólogos a la tuftsin.
- Tabla 2.- Rendimiento de Anticuerpos en Líquido Ascítico.

RESUMEN

Con el fin de determinar una respuesta de fase aguda, expresada como aumento de proteína C-reactiva (CRP), se midieron los niveles séricos de esta Proteína, en varios lotes de ratones de la cepa Balb/c, infectados experimentalmente con la bacteria *Staphylococcus aureus* cepa Cowan I,

La concentración de CRP se midió con un ensayo de ELISA específico para CRP. En todos los ratones inoculados con *S.aureus* se encontró un incremento de 7 a 8 veces en la concentración sérica de CRP sobre los niveles normales (en ratones no infectados), del 2° al 3° día postinfección. A pesar de los títulos elevados de anticuerpos y de la persistencia bacteriana de *S. aureus*, los niveles séricos de CRP empiezan a declinar gradualmente.

La concentración de CRP en ratones no infectados se mantuvo dentro del rango normal durante el periodo experimental. Los ratones infectados presentan concentraciones máximas de 0.9993 a 1.083 $\mu\text{g/ml}$. El establecer los niveles séricos de CRP quizá ayude a definir la severidad de un daño inflamatorio en animales infectados destinados a laboratorios experimentales y establecería las bases de un modelo animal de experimentación para estudios *in vivo* de la Proteína C-reactiva.

INTRODUCCION

Los agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos y parásitos potencialmente patógenos son capaces de activar mecanismos inmunológicos tanto celulares como humorales¹. Entre las bacterias, un grupo de gran interés son las piógenas, cuya importancia radica en que son los principales agentes causales de infecciones. El sistema inmune juega un papel fundamental en los procesos para el reconocimiento, ataque y eliminación de los agentes infecciosos.

La respuesta inmune comprende mecanismos específicos e inespecíficos que hacen frente a la presencia de un agente infeccioso. Los mecanismos específicos, como son los anticuerpos y las células T, están dirigidos en contra de antígenos o agentes infecciosos bien definidos.

Los anticuerpos presentan dos características de mucha utilidad. Primero, son extremadamente específicos, esto es, los anticuerpos se unen y destruyen a un antígeno determinado. Segundo, algunos anticuerpos, desde que son activados por un agente patógeno que entra al organismo, le confieren resistencia al organismo al estimular la producción de estas moléculas específicas; dos ejemplos son las respuestas inmunes contra la varicela infantil y sarampión. Es precisamente la especificidad de los anticuerpos que avalan a la tecnología de los anticuerpos monoclonales (mAb). No sólo pueden utilizarse para proteger de enfermedades, como lo es en terapias especiales, sino que también se utilizan para el diagnóstico de una amplia variedad de enfermedades, en la detección de drogas, productos bacterianos y virales, además de otras sustancias que no se presentan normalmente en la sangre de un organismo.

La especificidad definida de los mAb permite estudiar funciones de macromoléculas y células, por ejemplo antígenos de superficie y receptores que al ser bloqueados por anticuerpos específicos pueden definir funciones celulares.

Es por ello que esta tecnología ofrece un enorme potencial para investigación básica y aplicada en biología⁵⁴.

Retomando los mecanismos que participan en la inmunidad, la vía que complementa la respuesta inmune es la que involucra a los mecanismos inespecíficos que incluyen: **1)** células fagocíticas mononucleares y polimorfonucleares (PMN) que reconocen, adhieren, ingieren y destruyen a bacterias patógenas y **2)** proteínas séricas y fluidos extracelulares conocidos como opsoninas^{1, 2, 5} que se adhieren a las superficies de bacterias y en algunos casos las lisan directamente. Las opsoninas son moléculas de

naturaleza proteínica que se unen a la superficie de microorganismos patógenos, en donde se da un reconocimiento específico para que inicie el proceso de ingestión bacteriana. En el suero, las opsoninas más importantes son los anticuerpos antibacteriales y las proteínas del sistema de Complemento (C'). Otras proteínas séricas que actúan como opsoninas, bajo ciertas circunstancias, incluyen a la fibronectina (Fn), Componente P de Suero Amiloide (SAP) y a la Proteína C-reactiva (CRP).

Como resultado de la activación del sistema de C', se amplifica el proceso de fagocitosis del agente infeccioso. Dentro de la cascada del sistema de C' se llega a activar al complejo de ataque a membrana (MAC), el cual lisa a la bacteria. Así mismo, endotoxinas de origen bacteriano, estimulan a los macrófagos para la producción de citocinas, estas últimas regulan la respuesta inflamatoria y la actividad de otros tipos celulares como a las células endoteliales.

Dentro de la gran cantidad de citocinas se encuentran el Factor de Necrosis Tumoral $\alpha 1$ (TNF α), Interleucina 1 (IL1), Interleucina 6 (IL6) y las citocinas de bajo peso molecular como la familia de la Interleucina 8 (IL8). Las principales funciones fisiológicas de las citocinas derivadas de macrófagos son: estimular la inflamación inespecífica y amplificar la activación de linfocitos específicos iniciada por antígenos bacterianos. Las citocinas inducen la adhesión de neutrófilos y de monocitos al endotelio vascular en el sitio de infección. Después de la adhesión vascular se presenta la migración, acumulación local y la activación de las células inflamatorias. Estas citocinas también inducen fiebre y estimulan la síntesis de las Proteínas de Fase Aguda⁵, dos respuestas cuyos papeles fisiológicos aún no son bien conocidos. A su vez las citocinas funcionan como coestimuladores de los linfocitos T y B, lo que amplifica la respuesta inmune específica. Como consecuencia a una respuesta

inflamatoria contra endotoxinas bacteriales también se activan mecanismos alternos como es la respuesta de fase aguda^{2, 3, 5}.

ANTECEDENTES GENERALES

RESPUESTA DE FASE AGUDA Y PROTEINA C-REACTIVA (CRP)

El término Respuesta de Fase Aguda se refiere a un cambio en la concentración normal de algunas proteínas plasmáticas. Dentro del grupo de proteínas de "fase aguda" se encuentra la Proteína C-reactiva de humano (CRPh). Esta proteína fue descubierta por Tillet y Francis⁴ en 1930 quienes la describieron como precipitina del polisacárido C de *Pneumococco*. Se encontró sólo en suero de fase aguda, por lo que la CRP se le conoció como "Proteína de Fase Aguda". Ensayos específicos posteriores demostraron que las concentraciones de otras proteínas también se incrementaban en el suero de fase aguda por lo que hoy se les conoce como "Proteínas de Fase Aguda"⁵. La CRPh es la proteína de fase aguda característica en humanos, dado que sus concentraciones plasmáticas llegan a incrementarse varios cientos de veces. La CRPh se clasifica como una pentraxina sobre la base de su estructura y sus uniones específicas dependientes de la concentración de calcio⁶. Los integrantes de la familia de las pentraxinas conservan buena parte de su estructura y reactividades de unión. Todas las pentraxinas consisten de subunidades polipeptídicas de cadena sencilla con un arreglo cíclico pentagonal simétrico, raramente hexagonal (identificada por microscopía electrónica) se unen a iones Ca^{++} indispensables para desplegar sus actividades de unión-ligando. Los miembros de las CRP-like se unen a moléculas de fosforilcolina, mientras que las SAP-like se unen a residuos de carbohidratos. No todos los miembros de las pentraxinas son proteínas de fase aguda. Por ejemplo, en humanos, la CRP es una proteína de fase aguda y SAP no lo es; mientras que en el ratón SAP es una proteína de fase aguda mientras que la CRP de ratón es una proteína de fase aguda moderado. Estudios sobre la estructura primaria de pentraxinas correspondientes a distintas especies indican un rango de 50 a 75% de similitud⁷

ORIGEN CELULAR DE CRP

Hurlimann, y col⁸ en 1966, demostró la primera evidencia sobre el sitio de síntesis de CRP, la cual se produce en el hígado. No existe evidencia de que en otro tipo celular se sintetice. La CRP de conejo se relaciona estrechamente a la de humano en cuanto a su estructura y función como proteína de fase aguda además casi todos los trabajos experimentales sobre inducción, síntesis y expresión de CRP se ha realizado en conejos; aunque Kuta y Baum⁹ en 1986 demostraron que una subserie de linfocitos periféricos (no tipificados) tienen la capacidad de sintetizar CRP.

ESTRUCTURA DE LA PROTEINA C-REACTIVA DE HUMANO.

La CRP está compuesta de cinco subunidades idénticas, enlazadas por uniones no covalentes¹⁰, exhibe una apariencia pentagonal plana observada por microscopía electrónica. El peso molecular que se ha calculado para CRP es de 118,000 para la forma pentamérica nativa¹¹, (sobre la base de estudios de sedimentación al equilibrio). La estructura primaria de CRP fue determinada por secuencia de aminoácidos¹², subsecuentemente confirmada y corregida al secuenciar el cDNA y sus clonas genómicas¹³. Cada subunidad consiste de 206 residuos de aminoácidos y se calcula un peso molecular de 23,017¹³. Un puente disulfuro une a dos cisteínas de las posiciones 36 y 97¹². No existe en su secuencia de aminoácidos sitios potenciales para N-glicosilación así como tampoco presenta moléculas de carbohidratos. Dentro de la secuencia de aminoácidos de CRP se han detectado sitios homólogos que se comparten con otras proteínas, por ejemplo proteínas de mieloma que se unen a Fosfocolina (Pch), calmodulina, tuftsin y histonas (Tabla 1). Estudios de dicroísmo circular demuestran que CRP posee una estructura α hélice (34%) y β plegada (45%). Dos formas cristalinas de la CRP humana son obtenidas a partir de 2-metil-2,4-pentanediol, ambas con forma tetragonal¹⁴. Pero son los estudios de función rotacional las que confirman la estructura pentamérica de la CRP¹⁵.

CRP	REGIÓN HOMÓLOGA EN OTRAS PROTEÍNAS	SIGNIFICADO
39-FYTE	39-FYME (péptido de la proteína de mieloma, MoPC 603)	Se une a Pch
138-EQDSFGGNFE	Secuencia concenso para la unión de Ca ^{**} en calmodulina y moléculas relacionadas.	Unión de Ca ^{**}
27-TKPL	Tuftsina (TKPR)	Estimulación de fagocitosis
113-GKPR	GKKRSK en histona H2B	Localización nuclear
200-TKPQ	PKKKRK en el antígeno T de SV40, VTKKRK en laminina A,	
118-RKSLKK	AAKRVK en c-Myc humano	

Tabla 1.- Proteínas con sitios homólogos a la tuftsina

FUNCIONES DE LA CRP HUMANA.

A. PROPIEDADES DE UNIÓN-LIGANDO

1. Afinidad por Calcio y Fosforilcolina (Pch).

La primera reactividad descrita para la CRP fue para el polisacárido C de la pared celular de *Pneumococco* (PnC)⁴. La reacción de precipitación de la CRP y PnC requiere de la presencia de iones calcio⁵. La CRP se une a iones calcio con una constante de afinidad de $1.3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ ¹⁶. Mediante estudios de diálisis al equilibrio Kinoshita y col. En 1989 muestran una $K_d = 6 \times 10^{-5} \text{ M}$ para la unión de Ca⁺⁺ a la CRP y una valencia de 2 por subunidad de CRP¹⁷. La afinidad del ión calcio por CRP induce cambios alostéricos en la misma, esto está demostrado por las alteraciones en la región aromática detectadas en el espectro de la molécula por dicroísmo circular¹⁴. Una región altamente conservada en la secuencia de aminoácidos de todas las pentraxinas correspondiente a los residuos 138-147 de la CRP humana se propone como el sitio de unión de Ca⁺⁺¹⁸. Esta región es homóloga a los residuos de unión de Ca⁺⁺ en Calmodulina y fibrinógeno¹⁵

Tanto Gotshlich y Edelman y Tomazz, en 1967 realizaron estudios sobre la estructura del PnC y demostraron que por la naturaleza ácida de los constituyentes de la pared celular, de los grupos fosfato sobre PnC, son las principales moléculas reconocidas por CRP^{16, 19}. Se conocen variantes de grupos fosfato monoéster que se unen a la CRP con una constante de afinidad de $2 \text{ a } 3 \times 10^{-4} \text{ M}$ y una valencia de 1 por subunidad¹⁶. Más tarde Volanakis y Kaplan en 1971 demostraron que la Pch es el inhibidor más potente de la reacción de precipitación de CRP-PnC en comparación con los otros grupos fosfato monoéster, con lo cual se propuso que los residuos de Pch sobre PnC son los principales grupos determinantes de unión de la CRP²⁰. Kaplan y Volanakis (1974), Baldo, B.A. y col. (1977) y Löfström, G. (1944) describen la unión específica de la CRP por Pch utilizando emulsiones que contienen fosfatidilcolina

y otros polisacáridos tanto capsulares como de pared celular que presentan Pch²¹⁻²³. Experimentos de diálisis al equilibrio realizados en 1978 por Anderson, J.K. concluyen que en presencia de Ca^{++} , la CRP se une a Pch con una constante de asociación de $1.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ y una valencia de 1 por subunidad no covalente²⁴. Otras actividades de unión ligando para la CRP están referidas principalmente a moléculas relacionadas con la fosforilcolina. Pruebas de precipitación cuantitativa, realizadas por Oliveira, E.B. y col. en 1980, usando Pch y fosforiletanolamina substituida con albúmina sérica bovina, y ensayos de inhibición de haptenos proponen que el sitio de unión en la CRP consiste de un locus primario para la unión de grupos fosforil (aniónicos) y un segundo locus para la unión del grupo colina (catiónico)²⁵. La naturaleza bivalente del sitio de unión en la CRP para Pch fue confirmada al utilizar monoésteres de fosfato, derivados de colina y dipéptidos como inhibidores del sitio de unión de la CRP para Pch substituida con hemocianina de *Limulus* (KLH)²⁶. Determinante(s) antigénico(s) de la CRP dan reacción cruzada con determinantes idiotípicos T15 de una proteína de mieloma que se une a Pch²⁶⁻²⁷. En dichos experimentos se destaca que el tetrapéptido 39-FYTE de la CRP es parte del sitio de unión para Pch y además es homólogo a la secuencia 32-FYME de las proteínas de mieloma las cuales poseen un sitio de unión para Pch. Esta secuencia 32-FYME presenta dos residuos antigénicos de unión (Y_{33} y E_{35}) establecidos por cristalografía¹⁴. Sobre la base de secuencias de aminoácidos de CRP que pertenecen a varias

especies, se propuso que la región de unión para Pch está en los residuos altamente conservados (51-66); los residuos con carga positiva Lys₅₇ Arg₅₈ sin embargo, fueron los que se unieron a los grupos fosfato y los residuos con carga negativa Asp₆₀ y Glu₆₂ se unieron a residuos de colina¹⁸.

2.- AFINIDAD POR MATERIAL NUCLEAR

Robey y col. en 1984, describió que la CRP se une a cromatina y fragmentos de cromatina, en presencia de Ca⁺⁺ y no es inhibido por la presencia Pch. Los pentámeros de la CRP se unen a la cromatina ($K_d = 8 \times 10^{-7}$ M) con una relación estequiométrica de aproximadamente un sitio de unión de CRP por cada 160 pares de bases de ADN en cromatina²⁸. Las funciones de la CRP se relacionan con la activación o no activación del C'. Los complejos CRP-cromatina activan a C', esto último sugiere que este reactante de fase aguda está involucrado en la "limpieza" de material nuclear, especialmente como un mediador para remover ADN nuclear dependiente de C' y que la remoción subsecuente de la cromatina se efectúa por fagocitosis²⁹. La alteración estructural de la cromatina se manifiesta por la unión de la CRP al núcleo, lo cual amplifica la actividad enzimática de la nucleasa micrococcal. Por lo tanto, si se llega a una saturación en la interacción cromatina-CRP, se refleja en una supresión de la transcripción del ADN modificado²⁹. Lo anterior se demostró con ensayos en fase sólida para determinar la afinidad de la CRP por histonas, dando como resultado que se une sólo a H1 y H2A pero no a H3 ni H4³⁰.

3.- AFINIDAD POR OTROS LIGANDOS.

Higginbotham³¹ en 1970 reportó que la CRP reacciona con un polisacárido capsular de una bacteria pneumococal tipo IV que no presenta Pch, aunque esta reacción es inhibida por Pch³². Otros ligandos reportados para CRP son agarosa³³, galactanos de *Leishmania* spp³⁴, y materiales fúngicos³⁵. Ciertas policiones, que incluye a las aminas sulfatadas, polímeros de L-lisina, y proteínas catiónicas de leucocitos igualmente muestran reacción con la CRP³⁶. DiCamelli y col., demostraron la unión directa de la CRP a moléculas catiónicas ricas en arginina y lisina no

dependiente de Ca⁺⁺ y proponen que el sitio de unión sobre la molécula de la CRP es

distinto, pero quizás cercano al sitio de unión para PC³⁷. El uso de liposomas de varias composiciones, demostró la unión de la CRP a la cabeza polar de PC de un grupo de fosfolípidos³⁸. Otras interacciones son con vesículas unilaminares y liposomas multilaminares de PC que requieran la presencia de Lisofosfatidilcolina (LPC) en la bicapa artificial. Se descubrió que la unión se da de manera dependiente de Ca⁺⁺ e inhibida por PC³³. Esto último sugiere que se necesita que ocurra una alteración en la arquitectura normal de la bicapa lipídica para la interacción de la CRP con la cabeza polar de PC³⁸.

La presencia de residuos de galactosa amplifica la interacción de la CRP-PC³³. DeBeer y col³⁹. en 1982, reportaron que cuando la CRP se aplica sobre una fase sólida, de manera selectiva se une a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en concentraciones traza de lipoproteínas de muy baja densidad en suero humano total. Este fenómeno explicaría el significado en la limpieza y deposición de LDL³⁹. Salonen y col⁴⁰ en 1984 reportan que CRP se une a proteínas de matriz extracelular, como Fn. Cada molécula de la CRP se une a 9 moléculas de Fn con una K_d= 1.47 x 10⁻⁷ M estando Fn en una fase sólida⁴¹, o con una K_d= 1.5 X 10⁻⁸ cuando CRP está en una fase sólida⁴⁰. Variantes de la CRP presentan diferentes afinidades por Fn. La variante E42Q se une con mayor avidéz a Fn que la variante wat rCRP (40-1)⁴². Ambas presentan una afinidad similar por ligandos que poseen Pch. Esto último sugiere que los residuos E42Q están involucrados en la interacción con Fn pero no con Pch. Por otra parte el dominio C-terminal de Fn, en donde se incluye a las regiones de unión celular y unión a heparina, intervienen en la unión a la CRP^{40,41}.

La interacción CRP-Fn explicaría el porqué de la deposición de la CRP en tejidos dañados involucrados en la formación de la matriz extracelular necesaria para la reparación del tejido dañado^{40,41}. La CRP tiene afinidad por una proteína localizada en la membrana basal celular, la laminina que interactúa dependiendo de la concentración de Ca⁺⁺⁴³. Esta unión se satura a una proporción molar de 4 CRP/laminina. Esta interacción estaría influyendo como un medio para la concentración de CRP en sitios de tejido dañado actuando como un ligando para leucocitos, un evento que repercutiría en la eliminación de tejido destruido y de restos celulares⁴³. Esto sugiere que la CRP y en especial péptidos derivados de la misma estén involucrados en la reparación de

tejido dañado al promover la síntesis de proteínas de matriz extracelular⁴⁰⁻⁴¹.

B. INTERACCIONES DE LA PROTEÍNA C-REACTIVA CON EL SISTEMA DE COMPLEMENTO

La activación del sistema de C' por parte de la CRPh se determinó al trabajar con complejos CRP-PnC y CRP-emulsiones de lípidos (colesterol y PnC o esfingomielina)²¹. La activación del sistema de C' por parte de la CRP se da por vía clásica.

Posteriormente se reportó, que complejos de la CRP con una variedad de policationes sintéticos y naturales así como complejos de policationes-polianiones, activan al sistema de C'^{35, 36, 44, 45}. La interacción CRP con liposomas con una carga fuertemente positiva en la estructura de bicapa o CRP-liposomas que poseen LPC pueden también activar al sistema de C'^{33, 36, 46}. Al formar agregados inmunes CRP-PnC se presentan como precipitados insolubles que pueden ser fragmentados por C. Los componentes C3 se unen a CRP y a PnC durante la reacción de solubilización⁴⁷. Con el componente C4 la CRP se une a la cadena α por enlaces covalentes⁴⁸. De esta manera CRP activa la vía clásica de C a partir de C3 convertasa. Se incluye en la activación a C3a y C4a, C4b, C3b y iC3b. Pero los complejos de CRP al parecer no tienen la capacidad para promover la activación de la enzima C5 convertasa⁴⁹. Con lo anterior, los complejos que forma CRP no generan al factor quimiotáctico y por lo tanto al complejo que lisa a la membrana celular (C5b-9).

en especial péptidos derivados de la misma estén involucrados en la reparación de tejido dañado al promover la síntesis de proteínas de matriz extracelular⁴⁰⁻⁴¹.

B. INTERACCIONES DE LA PROTEÍNA C-REACTIVA CON EL SISTEMA DE COMPLEMENTO

La activación del sistema de C' por parte de la CRP se determinó al trabajar con complejos CRP-PnC y CRP-emulsiones de lípidos (colesterol y PnC o esfingomielina)²¹. La activación del sistema de C' por parte de la CRP se da por vía clásica.

Posteriormente se reportó, que complejos de la CRP con una variedad de policationes sintéticos y naturales así como complejos de policationes-polianiones, activan al sistema de C'^{35, 36, 44, 45}. La interacción CRP con liposomas con una carga fuertemente positiva en la estructura de bicapa o CRP-liposomas que poseen LPC pueden también activar al sistema de C'^{33, 36, 46}. Al formar agregados inmunes CRP-PnC se presentan como precipitados insolubles que pueden ser fragmentados por C. Los componentes C3 se unen a CRP y a PnC durante la reacción de solubilización⁴⁷. Con el componente C4 la CRP se une a la cadena α por enlaces covalentes⁴⁸. De esta manera CRP activa la vía clásica de C a partir de C3 convertasa. Se incluye en la activación a C3a y C4a, C4b, C3b y iC3b. Pero los complejos de CRP al parecer no tienen la capacidad para promover la activación de la enzima C5 convertasa⁴⁹. Con lo anterior, los complejos que forma CRP no generan al factor quimiotáctico y por lo tanto al complejo que lisa a la membrana celular (C5b-9).

ANTECEDENTES PARTICULARES

Mold, y col. en 1982⁶⁸ indica que CRP se une a *S. pneumoniae* vía determinantes de Pch principalmente, mientras que la unión a *S. anginosus-constellatus* puede ser inhibida por Pch o galactosa. Al utilizar CRP radiomarcada demuestran la afinidad por todas las cepas aisladas de *S. pneumoniae*, varios estreptococos de la especie *viridens*, establecen la poca o nula afinidad por bacterias gramnegativas y otros grampositivos ensayados y a un sólo aislado de *S. aureus*. En el modelo experimental descrito por Noble en 1965, utiliza ratones que al inyectarles subcutáneamente estafilococos mezclados con polvo de algodón presentan un proceso dermonecrótico agudo. Dado que este modelo animal es empleado ampliamente en experimentos sobre inmunidad contra estafilococos y con base en los antecedentes de las características de la CRP en este trabajo usamos la tecnología de hibridomas para la producción de mAb contra la proteína C reactiva humana³⁻⁵ y con ellos evaluar los niveles de este reactante de fase aguda en ratones de la cepa Balb/c, posterior a una infección experimental por *S. aureus* cepa Cowan I. La finalidad de evaluar CRP en ratones Balb/c es un aspecto que sería importante, para establecer un posible marcador de daño, posterior a un proceso infeccioso experimental. Existe una gran variedad de microorganismos potencialmente virulentos que inducen una respuesta inflamatoria aguda, tal es el caso de *Staphylococcus aureus*. Los dos primeros estudios que reportan la unión de CRP con bacterias establecen que es limitado a unos cuantos géneros. Patterson y Higgitbotham en 1965⁶⁴ destacan que al CRP de ratón aglutina a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (α y β hemolítico) mientras que con otras especies como *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* no interaccionan con CRP, por lo que los autores sugieren una reactividad de CRP por bacterias grampositivas. Kindmark describe en 1972⁶⁷ la unión a CRP de acuerdo a la capacidad selectiva de la bacteria y reporta que CRP se une de manera sustancial a *Streptococcus pneumoniae*, y cantidades menores se unen a *E. coli*.

Además debemos destacar que en los laboratorios dedicados a la producción de anticuerpos, las pruebas de control que evalúen el estado inmunológico de los animales experimentales serían importantes para optimizar la respuesta inmunológica y evitar al máximo la producción de anticuerpos inespecíficos ⁵⁵.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los niveles de la CRP con mAb, en la cepa de ratones Balb/c, como un indicador de infección aguda inespecífica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener mAb contra Proteína C-Reactiva (α CRP)
- Evaluar los niveles de CRP en ratones infectados experimentalmente con *Staphylococcus aureus*, utilizando mAb.
- Correlacionar la respuesta inmune específica anti-antígeno bacterianos (*Staphylococcus aureus* cepa Cowan I) con los niveles de la CRP.

Falta página

N° 14

METODOLOGIA

1.- Cultivo de células de mieloma.

La línea celular empleada en este trabajo está catalogada por Kearney, J.F. et al (1979) como P3/X63 -Ag8 -6. 5. 3. Fv. Los cultivos se crecieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un suplemento de Suero Fetal Bovino(SFB) Hyclone, penicilina (10%, 100UI/ml) y estreptomina (100µg/ml) y se mantuvieron a 37 °C y 5% de Bióxido de Carbono(CO₂). Previo a la fusión celular estas células se trataron con 8-azaguanina (10⁻⁴ M). La fusión celular se efectuó con células de mieloma en fase logarítmica, utilizando una proporción de 10⁶ células de bazo por 5 x 10⁷ células de mieloma^{53-54,62}. A menos que se especifique lo contrario todos los reactivos que se usaron en este proyecto fueron de grado reactivo de la marca Sigma Chemical.

2.- Inmunización de Animales⁵⁶.

Inmunización de ratones Balb/c para la obtención de anticuerpos monoclonales anti-CRP.

Se emplearon ratones machos de la cepa Balb/c de 6-8 semanas de edad, los cuales se sangraron previo a la inmunización. El antígeno empleado fue la Proteína C-reactiva de fluido ascítico humano (CRPh). Se utilizó para cada ratón 25 microgramos(µg) de proteína disuelta en Adjuvante Completo de Freund's (ACF) (Sigma Chemical) y para las subsecuentes inmunizaciones se disolvió con un precipitado de aluminio (Al₃OH). Todas las inmunizaciones se aplicaron por vía intraperitoneal (i.p.). Los ratones se sangraron al 4 día después de la tercera inmunización. Se determinó el título de respuesta de anticuerpos anti-CRP(αCRP) mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

De los sueros que resultaron positivos contra la proteína C-reactiva se seleccionó aquel cuyo título, por dilución seriada, resultó superior a 1:16,000 (ver Figura 1). Cuatro días antes de la fusión celular, los ratones se inmunizaron con la misma concentración de proteína utilizada anteriormente.

Inoculación de ratones Balb/c con bacterias para provocar un daño agudo.

Se usaron ratones de la cepa Balb/c de 6-8 semanas de edad. Los ratones se sangraron previo a la inmunización para obtener sueros preinmunes. El Antígeno que se usó, fue la bacteria *S. aureus* cepa Cowan ATCC 12598, disuelta en PBS estéril.

3.- Cuantificación de Proteínas

La concentración de proteínas de las muestras ocupadas en los ensayos se determinó por dos métodos:

I) Cuantificación de proteína por el método descrito por Bradford, M(1976)⁵⁷.

Por cada muestra se utilizaron 2.5 ml del reactivo. La concentración de proteína se midió por colorimetría a 595 nanómetros(nm) y se interpoló en una curva estándar de albúmina.

II) Absorción óptica a 280 nm. Se realizó sobre la base del coeficiente de extinción molar Albúmina Sérica Bovina(BSA) a 25°C (Kirschenbaum, 1973)⁵⁸. Se hicieron determinaciones directas de 1 mililitro (ml) de muestra en una celdilla de cuarzo de 1 cm de espesor.

4.- Preparación de Hibridomas.

La obtención de hibridomas se realizó conforme al protocolo descrito por Köhler y Milstein (1975)⁵³. Se extrajo el bazo de un ratón inmune, en condiciones de esterilidad, y se disgregó en 2 ml de SFB. La suspensión celular se puso en contacto con las células de mieloma y fueron lavadas dos veces con DMEM sin suero, el medio se separó por centrifugación a 1,500 revoluciones por minuto(r.p.m.). Al precipitado se le adicionó 1 ml de PEG 4000 (al 50% diluido en DMEM sin suero) durante 1 minuto. Esta suspensión celular se diluyó en 50 ml de medio DMEM con SFB (20%) la cual se distribuyó en 8 cajas para cultivo de 96 pozos y se incubó a 37 °C. Un día después, a cada pozo se le adicionó medio de cultivo de restricción HAT(Hipoxantina 10^{-4} M, Aminopterina 4×10^{-5} M y Timidina 1.6×10^{-6} M). El crecimiento celular se siguió con ayuda de un microscopio óptico invertido marca Olympus durante 20-30 días subsiguientes a la fusión celular. Con la finalidad de registrar el número de clones en cada pozo. En el transcurso de esos días los sobrenadantes fueron colectados para probar su actividad. Los medios de cultivo que reconocieron a la proteína C-Reactiva

de humano por ELISA e inmunotransferencia fueron subclonados por dilución limitante (se distribuyeron 48 células en cajas de 96 pozos con medio HT).

5.- Electroforesis

La separación de moléculas proteicas en un campo eléctrico, se emplea para identificarlas sobre la base de su(s) peso(s) molecular(es). Esta técnica se desarrolló de acuerdo al sistema de separación de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio(SDS-PAGE) descrito por Laemmli(1970)⁵⁹. Se prepararon las mezclas para los geles de SDS-PAGE a las concentraciones mencionadas anteriormente y se armó el sistema de electroforesis como a continuación se explica: Dos placas de vidrio fueron ensambladas y sujetas a presión, se colocaron sobre un soporte de plástico. Inmediatamente se agregó entre las placas la mezcla que corresponde al gel separador y se dejó que solidificara durante 30 minutos. Finalmente se agregó la mezcla que corresponde al gel concentrador y se colocó el peine. A este dispositivo se le colocó encima un reservorio donde se le vertió el buffer de corrida y se conectó a una fuente de poder a un voltaje de 30 V durante toda la noche. Al día siguiente se procedió a desmontar el dispositivo de electroforesis y se tiñó el gel con Azul de Coomassie durante 20 minutos y se destiñó con una solución de Metanol (10%)-Ácido acético (20%) con tres cambios de la misma.

Gel Separador		
	10%	12%
Acrilamida 30%/ Bis-acrilamida 0.8%	10 ml	12 ml
Tris-Cl/SDS 4X pH= 8.0	7.5 ml	7.5 ml
H ₂ O	12.5 ml	10.5 ml
APS 10%	0.1 ml	0.1 ml
Temed	0.02 ml	0.02 ml

Gel Concentrador	
Acrilamida 30%/ Bis-acrilamida 0.8%	1.3 ml
Tris-CI/SDS 4X pH= 6.8	2.5 ml
H ₂ O	6.1 ml
Temed	0.01 ml

6.- Para la selección de anticuerpos monoclonales se usó el ensayo inmunoenzimático **ELISA** (*ENZYME-LINKED-IMMUNOSORBENT-ASSAY*)descrito por Engvall, E. (1980) ⁶⁰.

Microplacas para ELISA. Las placas empleadas en el laboratorio son de cloruro de polivinilo de la marca COSTAR de 96 pozos.

El antígeno (CRP) se disolvió a una concentración de 10 mg/ml en un buffer de carbonato-bicarbonato pH 9.6 a cada pozo se le agregaron 50 µl y la placa se incubó a 37 °C, 3 hrs o 4°C durante toda la noche. Los sitios reactivos libres de la placa se saturaron con 200 µl de BSA-1%/PBS-tween 0.05% por una hora a 37°C. Posteriormente la placa se lavó tres veces la con una solución amortiguadora de fosfatos que llevó Tween 20(PBS-Tween 0.05%) y enseguida se agregó el anticuerpo monoclonal (Líquido Ascítico diluido o sobrenadante de medio de cultivo) como "primer anticuerpo".

Como control positivo se utilizó suero inmune diluido, y como controles negativos suero normal o buffer (50 µl por pozo). Se incubó durante 2 hrs. a 37 °C y se lavó como anteriormente se mencionó. Como segundo anticuerpo se adicionaron 50 µl de anticuerpo de chivo anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa diluido 1:2,000 (en el caso de usar anticuerpos biotinilados se aplicó streptavidina peroxidada 1:1,500), y se dejó incubando durante 1 hora a 37 °C. La reacción final del ensayo se hizo con 100 ml de una solución reveladora que contenía ácido cítrico (0.9605 gr./50 ml.), Fosfato de sodio dibásico (1.41965 gr./50 ml.), 4 mg/50 ml. de ortofenilendiamina y 4 ml de H₂O₂ 30%. La reacción se detuvo con 100 µl de H₂SO₄ 4M y la medición de colorimetría se realizó a 490_{nm} en un lector para placas de ELISA marca BIORAD.

7.- Producción de Líquido Ascítico anti-CRP⁵³⁻⁵⁴.

Se usaron 10 ratones Balb/c de 8-10 semanas de nacidos, a cada uno se les inyectó 500 μ l de Pristano (2,6,10,14,-tetrametilpentadecano) por vía i.p., 1 semana antes de inocular con los hibridomas. Antes de expandir los hibridomas se realizó un ensayo de ELISA para determinar el reconocimiento de los mAb anti-CRP. Posteriormente se crecieron en el medio de cultivo hasta tener una confluencia de 50×10^6 células. Se transfirió cada cultivo en tubos cónicos Falcon de 50 ml y se centrifugó a 1,500 r.p.m. en una Sorvall H-4000, durante 5 min. a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 20 ml de medio DMEM sin suero. Se centrifugó a 1,500 (r.p.m.) durante 5 min. y se desechó el sobrenadante. Esta maniobra se repitió dos veces y finalmente el paquete celular se resuspendió en 10 ml de DMEM o PBS. Se ajustó el número de células a 2×10^6 /ml con PBS o DMEM sin suero. La suspensión celular se inyectó (2ml/ratón) utilizando una jeringa de 10 ml. Se esperaron de 2-6 semanas para la obtención de líquido ascítico. La cosecha de líquido ascítico se hizo drenando a los ratones por vía i.p. con una aguja de 38 mm. El líquido ascítico se recuperó en un tubo falcón de 50 ml. Se centrifugó a 2 700 r.p.m. en una Sorvall H-4000, el sobrenadante se decantó y el precipitado se congeló a -20 °C.

8.- Caracterización de anti-CRP⁵⁴.

Para determinar el tipo de Inmunoglobulinas(Igs) se realizó un ensayo de ELISA como se explica en el punto 6 pero se utilizó un kit comercial que contiene anticuerpos de conejo contra diferentes isotipos de Igs de ratón. Como segundo anticuerpo se adicionó un anticuerpo de chivo anti-conejo conjugado a la enzima peroxidasa y se dejó incubando durante 1 hora a 37 °C. La reacción final del ensayo se hizo con 100 μ l de una solución reveladora que contenía ácido cítrico (0.9605 g/50 ml), Fosfato de sodio dibásico (1.42 g/50ml), 4 mg./50 ml. de ortofenilendiamina y 4 ml de H₂O₂ 30%. La reacción se detuvo con 100 μ l de H₂SO₄ 4M y la medición de colorimetría se realizó a 490_{nm} en un lector para placas de ELISA.

9.- Purificación de Inmunoglobulina de clase G(IgG) de Líquido ascítico ⁵⁴.

Previo a la preparación de la columna las muestras fueron centrifugadas a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y se ajustó el pH a 6.0-7.5. Se empacó la columna con un 1 ml de rProteína G Agarosa (Pierce) y se equilibró con 10 volúmenes del Buffer de Unión (0.53 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.87 g de Na_2HPO_4 y 8.77 g de $\text{NaCl}/1000$ ml) para posteriormente aplicar la muestra de anticuerpo. Se lavó la columna con 6-12 volúmenes del Buffer de Unión (esto dependiendo del tamaño y concentración de la muestra). Se aplicaron 6 volúmenes del Buffer de Unión (0.53 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.87 g de Na_2HPO_4 y 8.77 g de $\text{NaCl}/1000$ ml) para separar las IgG que se unieron a la columna.

10.- Biotinilización de anticuerpos anti-CRP purificados ⁵⁴.

A 1 ml de una solución stock de IgG (1mg/ml) se le agregó 1 ml de metaperiodato de sodio durante 20 minutos a 0°C en obscuridad. Se incubo con glicerol a una concentración final de 15 mM durante 5 minutos a 0°C. En este punto la muestra se dializó contra acetato de sodio 0.1 M pH 5.5 durante toda la noche a 4°C.

Se agregó biotina LC-Hidrácida a una concentración final de 5 mM agitando la muestra durante 2 horas. La muestra ya marcada con biotina se dializó contra la misma solución y finalmente las muestras fueron almacenadas a 4°C.

11.- Inmunotransferencia.

La transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa se hizo de acuerdo al protocolo descrito por Towbin, et al(1979)⁶¹. Se procedió a separar proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE)(I), se transfirió a papel de nitrocelulosa(II) se hizo la inmunodetección con anticuerpos(III).

Se separaron las proteínas en geles de poliacrilamida al 10% con SDS. Después se electrotransfirió en una cámara de electrotransferencia marca IDEA Scientific de la siguiente manera: Se cortó papel Whatman del # 3 y papel de nitrocelulosa de 0.45 mm (BIORAD) al tamaño del gel y se incubaron en el Buffer de Transferencia. El dispositivo de transferencia quedó como sigue:

- 1.- Hoja de papel Whatman.
- 2.- Papel de nitrocelulosa.
- 3.- Gel y
- 4.- Papel de nitrocelulosa.

Se colocaron empalmados dentro de dos placas de plástico sujetas a presión.

La cámara de transferencia se le agregó el buffer de transferencia para posteriormente sumergir dentro de ella el dispositivo de transferencia de modo tal que el papel de nitrocelulosa quedó orientado hacia el cátodo.

Se aplicaron 400 miliamperes (mA) durante 1 hr. Para detectar si hubo transferencia al papel de nitrocelulosa, este se tiñó con Rojo Ponceau (0.5%) y se retiró el colorante lavando con agua. Se lavaron con PBS-Tween 0.05%, incubando durante 1 hora en una suspensión de leche descremada Sveltes al 5% p/v en PBS-Tween 0.05%. Transcurrido el tiempo se lavó tres ocasiones con PBS-Tween 0.05% durante 5 minutos cada vez. El papel bloqueado se cortó en tiras de 3 mm. y se colocaron en pozos de 2 mm de profundidad. Se procuró mantener el papel con el antígeno hacia arriba. Entonces se emplearon 2.5 ml del anticuerpo monoclonal anti-CRP Líquido ascítico, marcado con biotina LC-Hidrazida o medio de cultivo de hibridomas, diluido en PBS. Posterior a la incubación con el anticuerpo, se lavó 3 veces con 80 ml de PBS-Tween 0.05%. Los papeles luego se incubaron con avidina conjugada con peroxidasa a una dilución 1:2000 en PBS-Tween 0.05% o PBS durante 1 hora. Se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.05%. Finalmente se utilizó una solución de 3'3' diaminobenzidina para detectar la reacción de anticuerpo-CRP.

12.- Ensayo inmunoenzimático para determinar niveles de CRP ⁶⁰.

Se obtuvieron los sueros de ratones (inoculados con 18×10^7 , 9×10^7 y 4.5×10^7 bacterias de *S.aureus* cepa Cowan I) y se disolvieron con Buffer bicar. pH= 9.6 50 mM para aplicarlos en microplacas para ELISA y se incubó a 37°C, 3 hrs o 4°C durante toda la noche. Los sitios reactivos libres de la placa se bloquearon con Gelatina 0.05%/PBS-tween 0.05% por una hora a 37°C. Posteriormente la placa se lavó tres

veces con PBS-Tween 0.05% y enseguida se agregó el anticuerpo monoclonal biotinilado (líquido ascítico o sobrenadante de medio de cultivo) .

Como control positivo se utilizaron sueros positivos para CRP y suero normal o buffer como controles negativos todo en un volumen de 50 μ l por pozo. Se incubó el complejo antígeno-anticuerpo durante 2 hrs. a 37 °C y se lavó como se mencionó antes. Finalmente se agregó streptavidina peroxidada como substrato cromogénico diluido incubando durante 1 hora a 37 °C. La reacción final del ensayo se hizo con 100 μ l de una solución reveladora que contenía ácido cítrico(0.9605 g/50 ml), Fosfato de sodio dibásico(1.42 g/50ml), 4 mg/50 ml. de ortofenilendiamina y 4 ml de H₂O₂ 30%.

La reacción se detuvo con 100 ml de H₂SO₄ 4M y la medición de colorimetría se realizó a 490_{nm} en un lector para placas de ELISA.

RESULTADOS

ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-CRP.

Los ratones fueron inmunizados por vía i.p. con CRP, a los 15 y 30 días se obtuvieron los sueros inmunes y se determinó el título de anticuerpos policlonales. Los niveles de anticuerpos anti-CRP fueron determinados por ELISA.

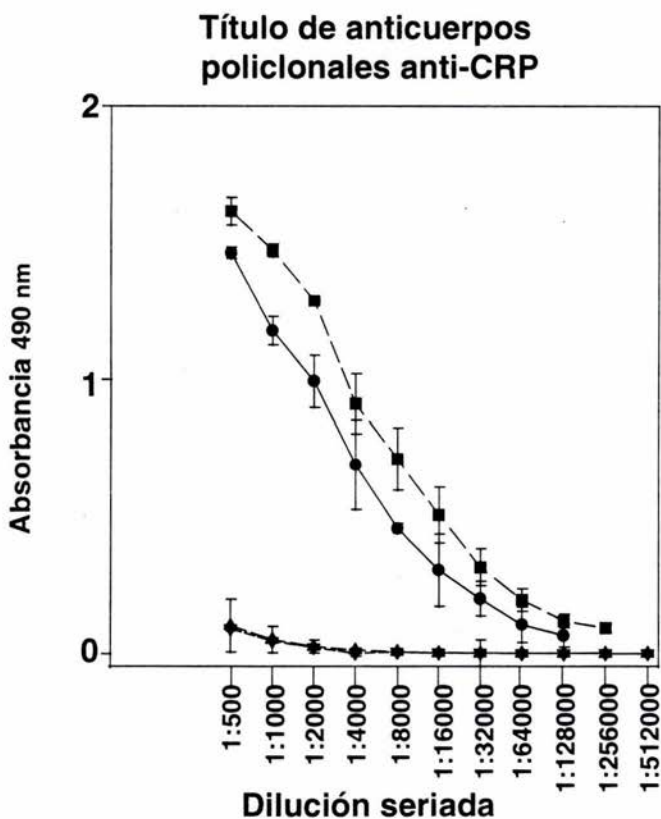


Figura 1. Título de anticuerpos policlonales anti-CRP. Un lote de ratones fue inmunizado por vía i.p. con CRPh. A los 15 y 30 días se determinó el título de anti-CRP mediante un ensayo de ELISA. Suero pre-inmune (ratón 3) ▼, Suero pre-inmune (ratón 4) ▲, Suero inmune (ratón 4) ●, Suero Inmune (ratón 3) ■.

De un lote inicial de 4 ratones seleccionamos aquel cuyo título sérico (ratón No. 3) dio una mayor actividad anti-CRP (ver Figura 1) a diferentes diluciones seriadas (1/500-1/16000). Los niveles de respuesta en los otros dos ratones fueron similares a los sueros pre-inmunes (Datos no mostrados). Cuatro días antes de la fusión este ratón fue inmunizado con 25 µg de CRP por vía i.p.

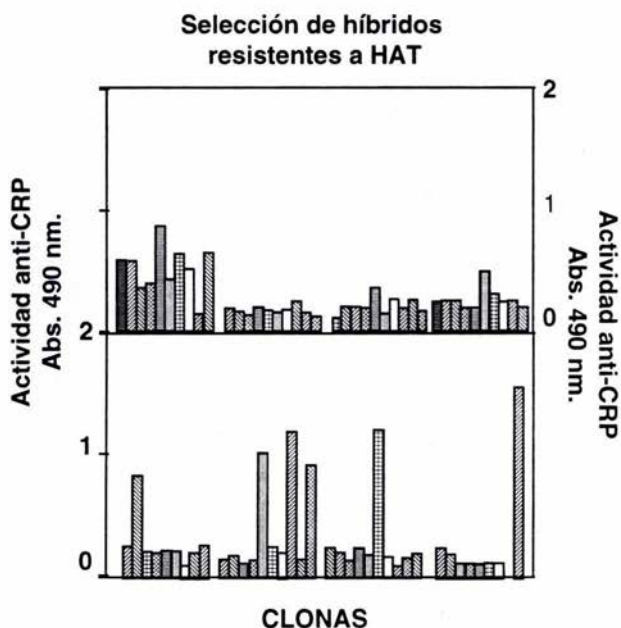


Figura 2. Selección de clonas resistentes a HAT con actividad anti-CRP. La selección de clonas positivas se realizó creciendo las células en medio HAT. Sólo los cultivos con absorbencias entre 0,4 y 1,2 fueron considerados positivos. En la gráfica las barras representan la actividad anti-CRP de diferentes clonas.

FUSION Y CLONACION

Inmediatamente después de la fusión (10^6 células de bazo por 5×10^7 células de mieloma) las células fueron distribuidas en 8 cajas petri con medio de cultivo de restricción HAT (Hipoxantina 10^{-4} M, Aminopterina 4×10^{-5} M y Timidina 1.6×10^{-6} M). El crecimiento celular se siguió con ayuda de un microscopio óptico invertido, marca Olympus, durante 20-30

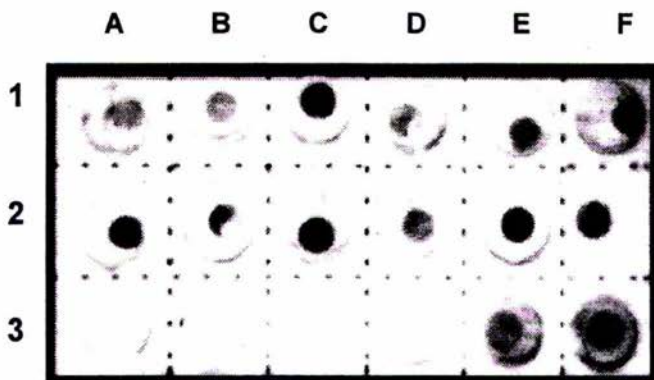


Figura 3. Reconocimiento de CRPh, con clonas seleccionadas por ELISA.

Se determinó la actividad anti-CRP de las clonas seleccionadas después de adherir a PNC CRP de humano. El control positivo(E3-F3) se realizó con un anticuerpo policlonal anti-CRP. El control negativo se realizó solo bloqueando los pozos(A3-D3). A1-A2→F1-F2 son las clonas seleccionadas.

días subsecuentes a la fusión celular. Una primera selección nos mostró 11 pozos que producen hibridomas que reconocen a la Proteína C-reactiva. Los pozos seleccionados fueron A1, A4, A6, A7, A9, B6, C2, F6, G5, G8 y G10. Se recuperaron 6 de esos 11 pozos después de la clonación por dilución limitante, los cuales se mantuvieron estables luego de una reclonación. Los ensayos de ELISA y Western Blot (ver Metodología) demuestran el reconocimiento de los anticuerpos. Los resultados de uno de estos ensayos son mostrados en

la Figura 2. Sólo los valores localizados entre 0.4-0.9(OD 490) o mayores fueron considerados para los análisis de Dot Blot y Western Blot (ver Figura 3 y Figura 4). Fue hasta este punto que las clonas seleccionadas se expandieron en placas de 24 pozos (0.5 ml por pozo). De todas estas clonas al cabo de 1-2 semanas se obtuvo una cantidad óptima de células, las cuales se congelaron o bien se utilizaron para inocular ratones Balb/c sensibilizados con pristano.



Figura 4. (I). Análisis electroforético de CRPh. Se empleó un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Carriles: A, marcadores de peso molecular; B Suero control de CRP; C y D CRP de humano.

(II) Análisis en Western Blot de CRP en SDS-PAGE con el uso de un mAb anti-CRP, el carril E corresponde a la detección de CRP empleando un mAb anti-CRP(H3) de ascitis purificado.

PRODUCCIÓN DE LÍQUIDO ASCÍTICO

Con la finalidad de obtener una mayor concentración de anticuerpos de los híbridos seleccionados por ELISA y Western Blot, se inocularon ratones Balb/c, previamente sensibilizados con pristano. Estos ratones con hibridomas en el peritoneo fueron

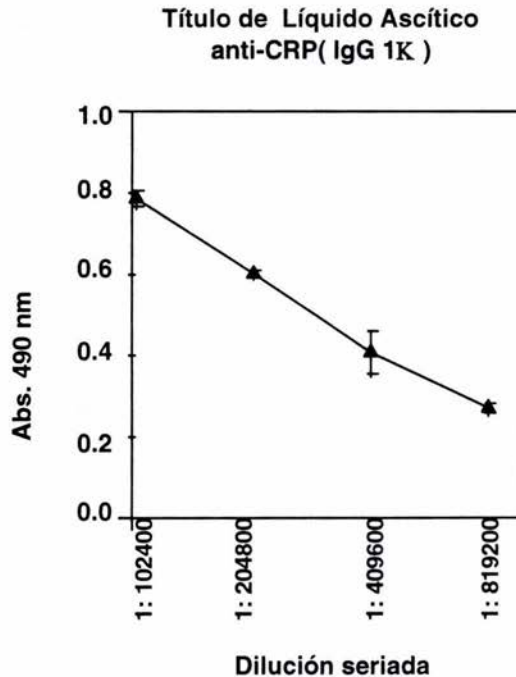


Figura 5. Líquido Ascítico. La producción a gran escala de anticuerpo anti-CRP se inició sensibilizando ratones Balb/c con pristano. Una semana más tarde se inyectaron 5×10^6 células por ratón. Dilución seriada (1:102400→1:819200) ▲

examinados durante 1 mes con el fin de verificar la producción de ascitis (ver Tabla de Rendimiento). Sólo con la clona designada como H3 (IgG1 κ) se indujo la producción de líquido ascítico, con un rango de actividad que fue de 0.2715 a 1.55 (OD 490 nm), esta última a una dilución de 1:51200 (ver Figura 5) mientras que el policlonal de ratón dio una lectura de 1.5 a una dilución de 1:500.

Rendimiento de Líquido Ascítico.

Volumen total de Líquido ascítico	10 ml
Concentración de proteína total	82 mg
Concentración de proteína en precipitado	15 mg
Anti-CRP purificada con proteína G	1.75 mg
Proteína que no se unió a la columna	13 mg

CUANTIFICACIÓN DE CRP EN SUEROS INFECTADOS

La Figura 6 muestra un ejemplo de una curva estándar para CRP ($r=0.9984$). La parte lineal de la curva quedó circunscrita entre 0.249 y 1.605 (OD₄₉₀), los cuales corresponden a 1.2467 y 9.973 $\mu\text{g/ml}$ de Proteína C-reactiva (CRP), respectivamente. Posteriormente se determinó la concentración sérica de la CRP en sueros de ratones Balb/c, infectados con *S.aureus* cepa Cowan I ATCC 12598 y no infectados, utilizando anticuerpos monoclonales anti-CRP. El valor medio para CRP fue de 0.1431 ± 0.045 $\mu\text{g/ml}$ en ratones no infectados (ver Figura 7). Los resultados de los ensayos inmunoenzimáticos realizados para determinar la concentración de CRP y niveles de anticuerpos, demuestran el establecimiento de una infección experimental en ratones Balb/c. Los títulos de anticuerpos fueron incrementándose en la primera y segunda semana postinfección, después de la cual alcanzaron un pico máximo (tercera y cuarta semana).

Entre la cuarta y quinta semana los niveles de respuesta permanecieron constantes (ver Figura 8). Los niveles de CRP se mantuvieron dentro del rango reportado, en el caso de los ratones no infectados, así como en los infectados unos minutos antes de

la inoculación bacteriana (día cero). Con el inicio de la infección experimental se destaca que, los niveles de este reactante de fase aguda empiezan a tener un incremento gradual, alcanzando un máximo entre el segundo y tercer día postinfección(ver Figura 9). Las concentraciones máximas de CRP determinadas en sueros de ratones Balb/c, a los cuales se les inoculó por vía i.p. la bacteria de *S.aureus*, fueron de 0.9993 a 1.083 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Curva estándar de Proteína C-reactiva

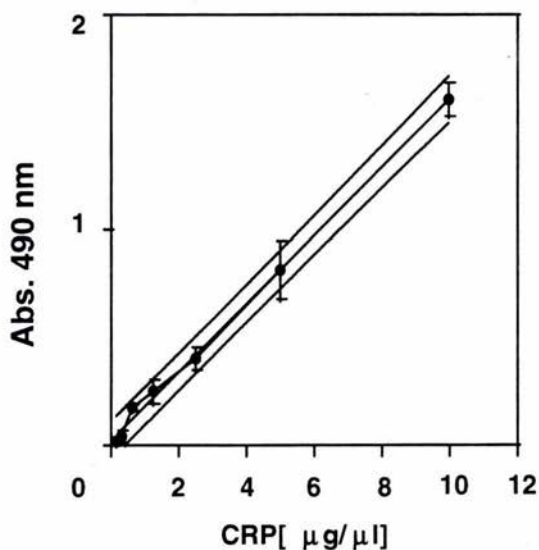


Figura 6. Curva estándar de CRP. Curva estándar para la cuantificación de CRP por E.L.I..S.A. Son mostrados los valores de absorbencia (OD 490) utilizando un mAb Anti-CRP (IgG1 κ) ●

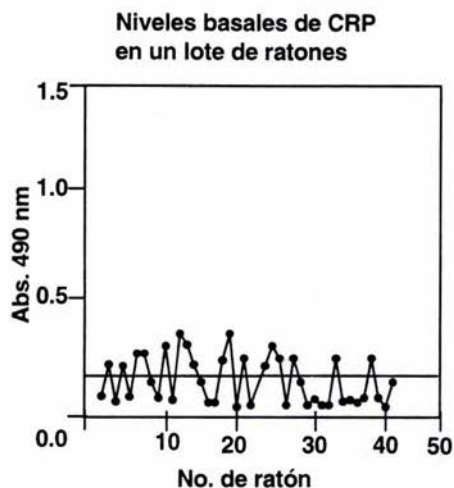


Figura 7. Monitoreo en los niveles de CRP en ratones Balb/c del Bioterio-CINVESTAV. Número de ratón evaluado para CRP ●.

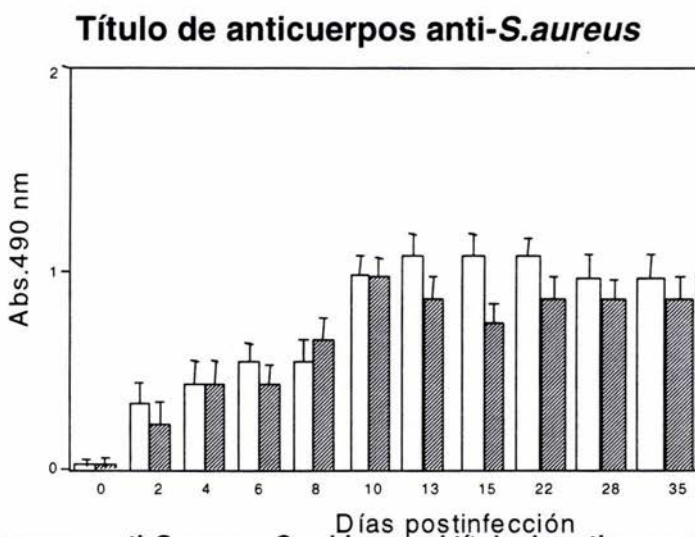


Figura 8. Anticuerpos anti-*S.aureus*. Cambios en el título de anticuerpos séricos anti-*S.aureus*.

Suero de ratones Balb/c infectados con 9.0×10^7 bacterias

Suero de ratones Balb/c infectados con 4.5×10^7 bacterias

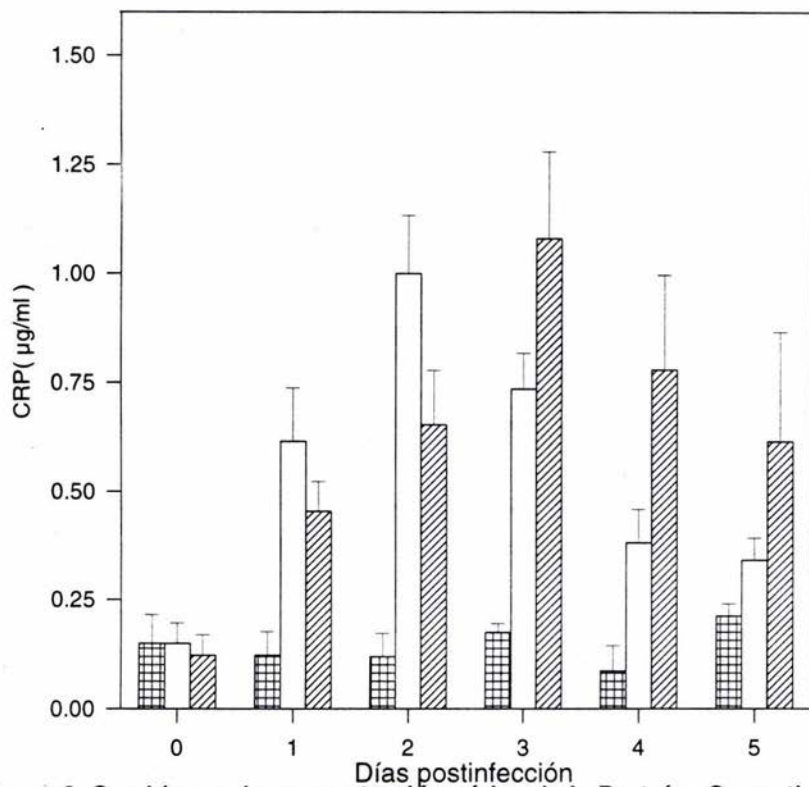


Figura 9. Cambios en la concentración sérica de la Proteína C-reactiva en ratones Balb/c infectados con la bacteria *Staphylococcus aureus* Cowan I.

Sueros de ratón Balb/c no infectados

Sueros de ratón Balb/c infectados con 9.0×10^7 bacterias

Sueros de ratón Balb/c infectados con 4.5×10^7 bacterias



DISCUSION

La función de la proteína C-reactiva (CRP) *in vivo* es un aspecto que se ha visto limitado, principalmente porque se carece de un modelo animal apropiado para estudios en laboratorio. Para la detección y cuantificación de la CRP se dispone comercialmente sólo de anticuerpos policlonales de importación, elaborados en chivo, y como es de presuponer, cada lote es diferente y por tanto los resultados no son reproducibles. También en nuestro medio es difícil encontrar reactivos biológicos específicos contra la CRP como, los anticuerpos monoclonales. En nuestro trabajo elaboramos anticuerpos monoclonales contra CRP con la finalidad de obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales específicos y homogéneos, y con estos, se cuantificó la Proteína C-reactiva, en ratones Balb/c infectados experimentalmente con la bacteria *S. aureus* cepa Cowan I. De esta manera obtuvimos un reactivo útil para detectar CRP en rata, humano (datos no mostrados) y ratón.

Utilizando la proteína C-reactiva de humano como antígeno en ensayos de ELISA se determinó que los ratones inmunizados con tres dosis de este antígeno producen títulos elevados de anticuerpos policlonales, con una dilución inicial de 1:500, al compararse con los sueros preinmunes de estos mismos ratones (Figura 1) y los sueros de ratones de los otros dos ratones cuyos títulos fueron bajos. Una vez determinado el título de anticuerpos policlonales, encontramos un valor óptimo con lo que se procedió a obtener los hibridomas, conforme al protocolo descrito por Kohler y Milstein⁵³. Previo a la fusión los ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 25 µg de CRPh. En los días subsiguientes a la fusión, fueron colectados los sobrenadantes de los medios de cultivo y se determinó la actividad anti-CRP mediante ensayos de ELISA. La Figura 2 nos muestra absorbencias de clonas con actividad anti-CRP, las cuales oscilaron entre 0.1090 y 1.217 (OD_{490 nm}).

De esta manera fueron seleccionadas 6 clonas de una fusión, para determinaciones posteriores. El análisis por Dot Blot y Western Blot (ver Figura 3 y Figura 4) de las clonas seleccionadas nos muestra un patrón de inmunoreactividades similares. Una explicación a esto se debería a la estructura pentamérica de la molécula de CRP,⁶ que

presenta 5 subunidades idénticas y por lo tanto estarían presentado cinco determinantes idénticos cuya secuencia de aminoácidos es repetida.¹⁰⁻¹²(ver Figura 2, Figura 3 y Figura 4). Después de la selección de los híbridos por ELISA y Western Blot fueron inoculados en ratones Balb/c, previamente sensibilizados con pristano. Estos ratones inoculados con altas concentraciones de hibridomas, permitió la selección de una clona(3H) (Figura 5) y su posterior caracterización. Esta clona presenta alta estabilidad y elevado título, útil para determinar la presencia de CRP en ratones Balb/c infectados con la bacteria *S.aureus* cepa Cowan I ATCC 12598.

Con el fin de determinar las diferencias en los niveles de CRP tanto en ratones de la cepa Balb/c, infectados y no infectados con *S. aureus*, se realizaron inmunoensayos enzimáticos (ELISA). Los resultados de estos ensayos nos muestran que el incremento de 7 y 8 veces la concentración de CRP en ratones Balb/c infectados con *S. aureus*, en comparación con los niveles basales en el suero de ratones Balb/c no tratados cuyos valores se ubican en $0.1336 \pm 0,1106 \mu\text{g/ml}$ (ver Figura 9), estos últimos concuerdan con los valores reportados por Siboo, R. et al. Por lo tanto, los resultados del presente trabajo demostraron que los niveles de la Proteína C-reactiva se incrementan de manera moderada en ratones infectados con la bacteria *S.aureus* cepa Cowan I, durante un estado de fase aguda infectivo, en comparación con lo que sucede en el humano, en donde los niveles de CRP llegan hasta 100 - 1000 veces sobre la concentración basal. Reportes previos a este trabajo, donde se usaron ratones de la cepa Fairfield-Webster infectados con *S. aureus*, reportan incrementos de 2.5 veces(evaluados por aglutinación), a las 24 hrs. post-infección⁶³. Las diferencias encontradas con respecto al presente trabajo posiblemente se deban a que nosotros estamos utilizando un reactivo biológico (anticuerpo monoclonal H3) y un ensayo notablemente más sensible además de que existen pocos estudios de cinéticas sobre la respuesta de CRP en ratones infectados.⁶³⁻⁶⁴ Los máximos niveles detectados en este trabajo tienden a ser bajos y concuerdan con lo reportado en el sentido que las concentraciones de CRP, en ratones con un estímulo que provoque una respuesta de fase aguda no alcanzan más de $2 \mu\text{g/ml}$.⁶⁵

CONCLUSIONES

Con la inmunización de un lote de ratones Balb/c empleando un esquema de inmunización de tres dosis de la proteína C-reactiva de humano se obtuvieron sueros inmunes con títulos elevados de anticuerpos, lo que dio la pauta para la producción de hibridomas anti-CRP. Inicialmente seleccionamos 6 clonas de anticuerpos monoclonales α CRP que reconocen de manera específica a la proteína C-reactiva, esto corroborado por ensayos de ELISA, Dot Blot y Western Blot. Posteriormente, la evaluación de esta proteína de fase aguda en ratones machos de la cepa Balb/c se logró utilizando anticuerpos monoclonales α CRP (con la clona designada como H3, IgG subclase 1 κ) de alta estabilidad y elevado título. Mediante inmunoensayos enzimáticos, se determinaron los niveles de CRP en suero los cuales fueron de 0.1331 ± 0.1101 $\mu\text{g/ml}$ en ratones no infectados, mientras que los infectados experimentalmente con *S.aureus* estuvieron en el rango de 0.9993 a 1.083 $\mu\text{g/ml}$ de suero. Al parecer CRP logra modular la respuesta inmune anti-*S.aureus*, ya que inicialmente los títulos de anticuerpos son bajos pero presentan un máximo de absorbancia en la tercera y cuarta semana post-infección. Finalmente la evaluación sérica de los niveles de CRP quizá ayude a definir la severidad de un daño inflamatorio en animales infectados destinados a laboratorios experimentales y puede establecer las bases de un modelo animal de experimentación para estudios *in vivo* de la Proteína C-reactiva.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- William, E. P.(1993). Infectious diseases and the Immune System. Scientific American. **269**(3):57-63
- 2.- Abbas, A.K. et al.(1994). Cellular and Molecular Immunology. 2a Edition. Saunders Philadelphia . pp. 232, 260, 302
- 3.- Roitt, I.(1991). Essential Immunology. 6a Edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp. 1-15
- 4.- Tillett, S.W. and Francis, T.(1930). Serological reactions in pneumonia with a non protein somatic fraction of Pneumococcus. J. Exp. Med. **34**:561-571.
- 5.- Pepys, M.B. and Baltz. (1983). Acute Phase Proteins with special references to C-reactive protein and related proteins(pentraxins) and Serum Amyloid A Protein. Adv. Immunol. **34**: 141-212
- 6.- Osmand, A.P. et al.(1977). Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1q as homologous protein displaying cyclic pentameric symmetry(pentraxins). Proc. Natl Acad. Scie. U.S.A. **74**: 739-743
- 7.- Pepys, M.B. et al.(1979). Serum Amyloid P protein component is an acute phase reactant in the mouse. Nature(London). **278**: 259-261
- 8.- Hurlimann, J. et al.(1966) The liver as the site of C-reactive protein formation. J.Exp.Med. **23**:365-378
- 9.- Kuta, A.E. and Baum, L.L.(1986). C-reactive protein is produced by small number of normal human peripheral blood lymphocytes. J. Exp. Med. **164**:321-326
- 10.- Gotshlich, E.C. and Edelman, G.M.(1965). C-reactive protein: a molecule composed of subunits Proc. Natl Acad. Scie. U.S.A. **54**:558-565
- 11.- Volanakis, J.E., Clements, N.L. and Schrohenloher, R.E.(1978). C-reactive protein purification by affinity chromatography and physicochemical characterization. J. Immunol. Methods. **23**:285-295

- 12.- Oliveira, E.B., Gotshlich, E.C. and Liu, T-Y.(1979). Primary structure of human C-reactive protein.
J. Biol. Chem. **254**: 489-502
- 13.- Lei, K.J., Liu, T., Zon, G., Soravia, E., Liu, T-Y. and Goldman, N.D.(1985). Genomic DNA sequence for human CRP.
J. Biol. Chem. **260**: 13377-13383
- 14.- Young, N.M. and Williams, R.E.(1978). Comparison of the secondary structures and binding sites of CRP and phosphorylcholine-binding murine myeloma proteins.
J. Immunol. **121**:1893-1898
- 15.- Myles, D.A.A., et al.(1990). Rotation function studies of human C-reactive protein.
J. Mol. Biol. **216**: 491-496
- 16.- Gotshlich, E.C. and Edelman, G.M.(1967). Binding properties and specificity of CRP.
Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. **67**: 706-712
- 17.- Kinoshita, C.M. et al.(1989). Elucidation of a protease-sensitive site involved in the binding of calcium to C-reactive protein.
Biochemistry. **28**: 9840-9848
- 18.- Liu, T-Y. et al.(1987). Comparison of protein structure and genomic structure of human, rabbit and Limulus C-reactive proteins: possible implications for function and evolution.
J. Prot. Chem. **6**: 263
- 19.- Tomazz, A.(1967). Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in pneumococcus.
Science: **157**:694-697
- 20.- Volanakis, J.E. and Kaplan, M.H.(1971). Specificity of C-reactive protein for choline phosphatase residues of pneumococcal C-polysaccharide.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **136**: 612-614
- 21.- Kaplan, M.H. and Volanakis, J.E.(1974). Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin
J. Immunol. **112**: 2135-2147
- 22.- Baldo, B.A., Fletcher, T.C. and Pepys, J.(1977). Isolation of a peptido-polysaccharide from the dermatophyte *Epidermophyton floccosum* and a study of reaction its with the human C-reactive protein and mouse anti-phosphorylcholine myeloma serum
Immunology. **32**: 831-842

- 23.- Löffström, G.(1944). Comparison between the reactions of acute phase serum with pneumococcus C-polysaccharide and with pneumococcus type 27.
Bri. J. Exp. Pathol. **25**:21-26
- 24.- Anderson, J.K. et al.(1978). Comparative studies on the binding specificities of C-reactive protein for phosphorylcholine
Fed. Proc. **37**: 1495(Abstrac)
- 25.- Oliveira, E.B. et al.(1980). Comparative studies on the binding properties of human and rabbit C-reactive proteins.
J. Immunol. **124**: 1396-1402
- 26.- Barnum, S. et al.(1982). Comparative studies on the binding specificities of C-reactive protein and HOPC8.
Ann. N.Y. Acad. Scie. **389**: 431-434
- 27.- Vasta, G.R. et al.(1984). Invertebrate recognition protein cross-reacts with an immunoglobulin idiotype.
J. Exp. Med. **153**: 1604-1614
- 28.- Robey, F.A. et al.(1984). Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles: a possible physiological role of C-reactive protein.
J. Biol. Chem. **259**: 7311-7316
- 29.- Shephard, E.G. et al.(1986) Functional effects of C-reactive protein binding to nuclei.
Immunology. **58**:489-494
- 30.- Duclos, T.W. et al.(1988). Analysis of the binding of C-reactive protein to histones and chromatin.
J. Immunol. **141**: 4266-4270
- 31.- Higginbotham, J.D. et al.(1970). Degradation of a pneumococcal type-specific polysaccharide with exposure of group-specificity.
Proc. Natl Acad. Scie. U.S.A. **67**: 138-142
- 32.- Heldelberger, M. et al.(1972). Inhibition experiments with pneumococcal C and depyruvylated type-IV polysaccharide.
Carbohydr. Res. **22**: 1-4
- 33.- Volanakis, J.E. and Narkates, A.J.(1981). Interaction of C-reactive protein with martificial phosphatidilcholine bilayers.
J. Immunol. **126**: 1820-1825
- 34.- Pritchard, D.G. et al.(1985). C-reactive protein binds leishmanial excreted factors.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **178**: 500-503

- 35.- Jensen, T.D.B. et al.(1986). Binding of C-reactive protein to *Aspergillus fumigatus* fractions.
J. Med. Microbiol. **21**: 173-177
- 36.- Siegel, J. et al.(1975). Interactions of C-reactive protein with the complement system. II . C-reactive protein-mediated consumption of complement by poly-L-polymers and others polycations, lysin.
J. Exp. Med.**142**: 709-721
- 37.- Dicamelli, R. et al.(1980). Binding reactivity of C-reactive protein for polycations.
J. Immunol. **125**: 1933-1938
- 38.- Volanakis, J.E. and Wirtz, K.W.A.(1979). Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidilcholine bilayers. Nature(London). **281**: 155-157
- 39.- Debeer , F.C. et al.(1982). Low lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated C-reactive protein.
J. Exp. Med. **156**: 230-242
- 40.- Salonen, E.M. et al.(1984). Binding of fibronectin by the acute phase reactant C-reactive protein.
J. Biol. Chem. **259**: 1496-1501
- 41.- Tseng, J. and Mortensen, R.F.(1988). Binding of C-reactive protein to plasma fibronectin occurs via the phosphorylcholine-binding site.
Mol. Immunol. **25**: 679-686
- 42.- Agrawal, A. et al.(1992). Probing the phosphocholine-binding site of human C-reactive protein by site-directed mutagenesis.
J. Biol. Chem. **267**:25352-25358
- 43.- Swanson, S.J. et al.(1989). Characteristics of the binding of human C-reactive protein to laminin.
J. Cell. Biochem. **40**: 121-132
- 44.- Robey, F.A. et al.(1985). C-reactive protein mediates the solubilization of nuclear DNA by complement in vitro.
J. Exp. Med. **161**: 1344-1356
- 45.- Claus, D.R. et al.(1977). Complement activation by interaction of polyanions and polycations. III. Complement activation by interaction of multiple polyanions and polycations in the presence of C-reactive protein.
J. Immunol. **118**: 83-87
- 46.- Volanakis, J.E.(1982). Complement activation by C-reactive protein complexes.
Ann. N.Y. Acad. Scie. **389**: 235-250

- 47.- Volanakis, J.E.(1982). Complement induced solubilization of reactive protein-pneumococcal C-polysaccharide precipitates: evidence for covalent binding of complement proteins to C-reactive protein and to pneumococcal C-polysaccharide. *J. Immunol.* **128**: 2745-2750
- 48.- Volanakis, J.E. and Narkates. A.J.(1983). Binding of human C4 to C-reactive protein-pneumococcal C-polysaccharide complexes during activation of the classical complement pathway. *Mol. Immunol.* **20**: 1201-1207
- 49.- Berman, S., Gewurz, H. and Mold, C.(1986). Binding of C- reactive protein to nucleated cells leads to complement activation without cytolysis. *J. Immunol.* **136**: 1354-1359
- 50.- Löfström, G. (1943). Nonspecific capsular swelling in pneumococci: serologic and clinical study. *Acta. Med. Scand.* **141**: 95-107
- 51.- Hokama, Y., et al.(1962). In vitro effects of C-reactive protein on phagocytosis. *J. Bacteriol.* **83**: 1017-1024
- 52.- Kindmark, C-O.(1971). Stimulating effect of C-reactive protein on phagocytosis of various of pathogenic bacteria. *Clin. Exp. Immunol.* **8**: 941
- 53.- Köhler, G. and Milstein, C.(1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity . *Nature(London).* **256**: 495-497
- 54.- Galfre, G. and Milstein, C.(1981). Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures. *Meth. Enzym.* **73**: 3-46
- 55.- Fox, J.G., Cohen, B.J. and Loew, F.M.(1984). Laboratory Animal Medicine American College of Laboratory. Animal Medicine Series. pp. 44-50, 87
- 56.- Vaitukaitis, J.L.(1981). Production of a antisera with small doses of immunogen : Multiple intradermal injections. *Meth. Enzym.* **73**: 46-52
- 57.- Bradford, M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the Quantitation of microgram quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

- 58.- Kirschenbaum, D.M.(1973). Molar Absorptivity and $A_{11\%cm}$. Values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. VIII. *Anal Biochem.* **55**: 166-192
- 59.- Laemmli, U.K.(1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature(London)*. **227**:680-685
- 60.- Engvall, E.(1980). Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. *Meth. Enzym.* **70**: 419-449
- 61.- Towbin, H.T.(1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Scie.* **76**:4350-4354
- 62.- Kearney, J.F. et al(1979). A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines *J. Immunol.* **123**: 1548-1550
- 63.- Patterson, L.T., Harper, J.M. and Higginbotham, R.D.(1968). Association of C-reactive Protein and Circulating Leukocytes with resistance to *Staphylococcus aureus*. Infection in Endotoxin-treated Mice and Rabbits. *J. of Bacteriology.* **95**: 1375-1379
- 64.- Patterson, L.T. and Higginbotham, R.D.(1965). Mouse C-reactive Protein and Endotoxin-Induced Resistance. *J. of Bacteriology.* **90**: 1520-1524
- 65.- Nam-On KU and Mortensen, R.F.(1993). Cloning and tissue-specific expression of the gene for mouse C-reactive protein. *Biochem. J.* **295**: 379-386
- 66.- Siboo, R.(1977). A fluorescent immunoassay for the quantification of C-reactive protein. *J. Immunol. Methods.* **23**: 59-67
- 67.- Kindmark, C.-O. 1972. In vitro binding of human C-reactive protein by some pathogenic bacteria and zymosan. *Clin. Exp.limmunol.* **11**: 283-289.
- 68.- Mold C., Nakayama, S., Holzer, T.J. , Gewurz, H. and Du Clos, T.W.1981. C-reactive protein is protective against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *J. Exp. Med.* **154**: 1703-1708
- 69.- Noble, W.(1965). "The production of subcutaneous staphylococcal skin lesions in mice. *Brit. J. exp. Path.* **46**: 254