

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA C-REACTIVA (CRP) CANINA

Comparison of two methods for canine c-reactive protein (crp) isolation and purification

Parra M^a. D.¹, Cabezas-Herrera J.², Cerón J.J.^{1*}

¹ Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. Campus de Espinardo Espinardo 30100 Murcia

² Unidad de Investigación. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. El Palmar 30120 Murcia

* Autor de referencia: jjceron@um.es

RESUMEN

La proteína C-reactiva (CRP) es una de las principales proteínas de fase aguda en el perro con un incremento rápido y pronunciado en respuesta a la infección o el daño tisular. Numerosos estudios clínicos y experimentales indican que el análisis de la proteína ayuda en la evaluación, diagnóstico y monitorización de diversas enfermedades inflamatorias. La disponibilidad de CRP canina pura permitiría su empleo como estándar en inmunoensayos de la CRP canina o como inmunógeno de cara a la obtención de anticuerpos anti-CRP canina. En el presente trabajo, se aisló la CRP a partir de suero de fase aguda canino, recurriendo a dos técnicas diferentes:

1. Inmunopurificación, empleando anticuerpos policlonales anti-CRP canina unidos a una matriz de sefara rosa activada con bromuro de cianógeno.
2. Cromatografía de afinidad, usando una columna con fosforiletanolamina unida a agarosa a través de enlace epoxi.

La pureza de las proteínas obtenidas con las dos metodologías fue valorada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Ambas técnicas son aptas para purificar la CRP canina, aunque la cromatografía de afinidad proporcionó un mejor rendimiento tanto en su pureza como en la cantidad de CRP obtenida. Además, la cromatografía de afinidad es una alternativa más barata, ya que no precisa el uso de anticuerpos, que normalmente son reactivos de coste elevado.

Palabras clave: CRP, perro, inmunopurificación, fosforiletanolamina, SDS-PAGE.

ABSTRACT

C-reactive protein (CRP) is one of the major acute phase proteins in dogs with a pronounced and rapid increase in response to infection and tissue injury. Canine CRP analysis has demonstrated to be useful in many

clinical and experimental situations for evaluating, diagnosing and monitoring several inflammatory processes. Purified CRP could be used as a calibrator in immunoassays or as an antigen for producing anti-canine CRP antibodies. In the present study CRP was isolated from canine acute phase serum by using two different techniques:

1. Immunopurification, by using polyclonal anti-CRP antibodies bound to CNBr-sepharose.
2. Affinity chromatography on agarose coupled with phosphorylethanolamine through epoxy bound.

The purity of the purified proteins with both methodologies was assessed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Both methods could be applied for canine CRP purification, however affinity chromatography provided a more purified protein and in bigger amount than immunopurification did and besides constitutes a cheaper option since antibodies, which represent a very expensive stuff, are not needed.

Key words: CRP, dog, immunopurification, phosphorylethanolamine, SDS-PAGE.

1. INTRODUCCIÓN

La respuesta de fase aguda es la reacción que se produce en el animal como respuesta a alteraciones de la hemostasia causadas por infección, traumas, crecimiento neoplásico o desórdenes inmunológicos (Kushner et al., 1981). Dicha respuesta incluye cambios en las concentraciones plasmáticas de ciertas proteínas presentes en el plasma denominadas **proteínas de fase aguda** (PFAs), que son sintetizadas fundamentalmente a nivel hepático (Eckersall, 1995).

En el perro, las proteínas de fase aguda que sufren un mayor incremento, y por tanto se consideran proteínas de fase aguda mayores, son la **proteína C-reactiva (CRP)** y el amiloide A sérico, siendo la haptoglobina, la ceruloplasmina y la α -1 glicoproteína ácida, proteínas de fase aguda moderadas (Solter et al., 1991; Eckersall, 2000).

La proteína C-reactiva, pertenece a la familia de proteínas plasmáticas conocidas como pentraxinas debido a su apariencia pentamérica anular al ser observada con microscopio electrónico. El aislamiento de la CRP canina y el desarrollo de antisueros específicos que permitieron su cuantificación tuvo lugar en 1970-1972 por Riley y Zontine. Caspi et al., (1984) profundizaron en la caracterización de la proteína C-reactiva en el perro, mostrando que se trataba de una glicoproteína formada por cinco

subunidades unidas por enlaces no covalentes, de las cuales sólo dos subunidades estaban glicosiladas. Mediante SDS-PAGE aparecieron dos bandas espaciadas cuyo peso molecular fue de 28.600 y 24.600 respectivamente. Por otra parte, su masa molecular estimada mediante cromatografía de filtración en gel en una columna de Sephacryl S-300, calibrada con proteínas globulares de peso molecular conocido fue de 102.300 daltons.

Entre las funciones de la CRP destaca su habilidad para reconocer patógenos y mediar en su eliminación mediante la activación del sistema del complemento y las células fagocíticas, lo que hace de la proteína un constituyente muy importante de la primera línea de defensa innata (Volanakis, 1982; Bharadwaj et al., 1999). Por otra parte, la proteína parece jugar cierto papel en la eliminación de células apoptóticas y necróticas, contribuyendo de esta manera a la restauración de la estructura y función de los tejidos dañados (Gershov et al., 2000).

Se ha demostrado que el análisis de la proteína C-reactiva canina puede ser muy útil para evaluar inflamación en numerosas condiciones patológicas (Martínez-Subiela et al., 2002; Kjelgaard-Hansen et al., 2003 a, b), algunas de las cuales aparecen resumidas en el Cuadro 1.

En medicina veterinaria, a pesar de que los estudios sobre la CRP canina han crecido a un ritmo exponencial en los últimos años (Kjelgaard-Hansen, 2004), no existe todavía una

aplicación generalizada del análisis de esta PFA en la clínica canina, reduciéndose su uso a nivel experimental. Entre los principales motivos responsables de que su uso no se haya extendido figura la ausencia de material de referencia de la especie canina, lo que impide la obtención de resultados comparables entre diferentes laboratorios.

Así pues, el objetivo del presente estudio fue la purificación de la proteína C-reactiva canina, para lo cual se compararon dos técnicas ampliamente utilizadas en la purificación de proteínas: la inmunopurificación y la cromatografía de afinidad. Esta última metodología ha sido aplicada previamente en diversos estudios para la purificación de la CRP en el perro (Eckersall et al., 1989; Fujise et al., 1992; Yamamoto et al., 1993).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

La purificación de la CRP canina se llevó a cabo de dos formas diferentes:

- a) mediante **inmunopurificación**, empleando una columna construida con anticuerpos policlonales anti-CRP canina producidos en cabra, unidos a una matriz de sefarosa activada con bromuro de cianógeno.
- b) por **cromatografía de afinidad**, a través de una columna de fosforiletanolamina unida a agarosa mediante enlace epoxi (PEAE-agarosa).

A ambas columnas se les aplicó suero de fase aguda, que se obtuvo a partir de sangre de perros que acudían al Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia con distintas patologías.

La pureza de la proteína obtenida por ambas técnicas fue valorada mediante electroforesis disociante en geles de poliacrilamida al 10%, empleando mercaptoetanol como agente reductor y azul coomassie para la tinción de proteínas. Los marcadores de peso molecular

fueron suministrados por la casa comercial Sigma (España).

Los rendimientos de la purificación de ambos métodos se calcularon como el porcentaje de proteína obtenida respecto a la introducida.

2.1. Inmunopurificación de CRP canina

La activación de matrices por bromuro de cianógeno es uno de los métodos más empleados para la preparación de columnas de afinidad con anticuerpos. Las ventajas son la alta capacidad de unión y la extensiva literatura disponible que apoyan su empleo. El mayor inconveniente de este protocolo es la alta toxicidad de los reactivos de activación, aunque este problema ha sido resuelto por la comercialización de las resinas ya activadas.

Para llevar a cabo la inmunopurificación fueron necesarios los siguientes tampones y reactivos:

1. Tampón de acoplamiento NaHCO_3 0,2M, NaCl 0,5 M pH 8,5.
2. HCl 1mM
3. Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,5 M pH 8.
4. Tampón acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 4.
5. Tampón fosfato 20 mM, NaCl 0,28 M (PBS), pH 7,2.
6. CNBr-sefarosa 4B Fast Flow de Pharmacia (Suecia).
7. Anticuerpos de cabra anti-CRP canina (donados por el Profesor Shizuo Yamamoto del Laboratorio de Inmunología de la Universidad de Azabu, Japón) con una concentración de 1,28 mg/ml.
8. Columna de plástico.
9. Bolsas de diálisis.

• Hidratación del gel y diálisis de los anticuerpos.

Se preparó una columna de inmunofinidad mediante la unión de anticuerpos anti-CRP a sefarosa activada por bromuro de cianógeno. En la fabricación de las columna se hidrataron 0,3

g. de la sefarosa en 10 ml de HCl 1mM durante 30 min. a temperatura ambiente Seguidamente, el gel hidratado se colocó en una columna cromatográfica y se lavó con 15 volúmenes de gel con HCl 1mM. Finalmente, se lavó con 30 ml de tampón de acoplamiento. El volumen de resina así obtenido fue de 1,2 ml.

La unión de ligandos, en nuestro caso de anticuerpos, a sefarosa activada por bromuro de cianógeno requiere la ausencia de grupos amino en la muestra a acoplar. Por esto, la solución conteniendo los anticuerpos se dializó frente a tampón de acoplamiento y así cumplir con dos objetivos: la eliminación de los grupos amino y disponer de anticuerpos en el tampón de acoplamiento. La cantidad necesaria de anticuerpos se calculó como se describe a continuación:

Según los fabricantes, la capacidad de unión de la sefarosa es de 5 mg de anticuerpo por cada ml de gel hidratado. Esto indica que los 1,2 ml de CNBr-sefarosa obtenidos pueden soportar hasta 6 mg del antisuero (4,68 ml de la solución del policlonal). Sin embargo, decidimos emplear 2 ml (2,56 mg) de la solución de anticuerpos para evitar una saturación excesiva de la sefarosa.

Así pues, se dializaron 2 ml de la solución de los anticuerpos. En primer lugar, se hidrató la membrana de diálisis en agua destilada durante al menos una hora. Tras lavar la cara interna de la membrana de diálisis, se selló un extremo con una pinza de diálisis, se añadió el volumen de la solución de anticuerpos y se cerró el otro extremo de la membrana intentando no atrapar burbujas de aire en su interior. Los extremos de la bolsa de diálisis se aseguraron con lazos de hilos de nylon. Seguidamente, la bolsa así formada se sumergió en un exceso (100 veces el volumen a dializar) de tampón de acoplamiento previamente enfriado a 4° C, temperatura en la que transcurrió todo el proceso de diálisis. El tiempo total de diálisis se aproximó a 16 h, siempre con agitación, y se realizaron tres cambios de tampón.

• Reacción de acoplamiento.

La reacción de acoplamiento gel-anticuerpo tiene que ser controlada para asegurar al máximo un óptimo funcionamiento de la cromatografía de inmunoafinidad. Para ello, la cinética de la reacción se monitoriza por la medida de absorbancia a 280 nm (espectrofotómetro Power Wave™ XS; Bio-Tek Instruments, Inc., Estados Unidos) de la solución de anticuerpos a intervalos cortos de tiempo y cuando se estima que aproximadamente el 80% de los anticuerpos se han unido a la resina, se detiene la reacción. El objetivo que se persigue es evitar un acoplamiento excesivo, o lo que es lo mismo, la unión de los anticuerpos a la sefarosa por numerosos sitios, que finalmente produce una pérdida de actividad de los anticuerpos anclados a la matriz.

Brevemente, los pasos seguidos en el acoplamiento fueron:

1. Se retiró el exceso de tampón de acoplamiento de unos 2 ml de resina previamente hidratada como se describió en el punto anterior.
2. Se añadieron 2 ml de la solución de anticuerpo dializado y concentrado para iniciar la reacción.
3. Cuando la absorbancia de la mezcla de reacción se aproximó al 20-30 % de la absorbancia inicial (70-80% de los anticuerpos se han unido a la matriz) se detuvo la reacción. En un ensayo tipo, la reacción se detuvo a los 30 min. después de iniciada la reacción y con un 72,8 % de los anticuerpos unidos.

Seguidamente, se lavó la columna con unos 20 ml de tampón de acoplamiento para eliminar el ligando no unido y posteriormente se bloqueó el exceso de lugares activos de la sefarosa con 2,7 ml de TrisHCl 0,1 M pH 8 a temperatura ambiente, colocando la columna en agitación continua durante 2 horas.

Transcurrido este tiempo se regeneró la columna con lavados alternos de tampón acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 4 y tampón Tris HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 8, empleando 20 ml de

tampón en cada ciclo de lavado. Finalmente se lavó con PBS pH 7,2.

• Inmunopurificación de la CRP canina.

Un volumen de 3,5 ml de suero canino de fase aguda se diluyó con 1,5 ml de tampón PBS y se mezcló con la sefarosa-anti CRP formada según se detalla en el punto anterior. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C en agitación continua.

Al día siguiente (16 h de incubación total) se determinó la concentración de CRP del sobrenadante (CRP no unida) y del suero de fase aguda empleado. Se utilizó un ELISA comercial (Tridelta Development Ltd., Irlanda), específico para la CRP canina.

Tras calcular la cantidad de CRP unida se procedió a la elución. En primer lugar se lavó la columna con 10 ml de tampón PBS conteniendo NaCl 2 M, para eliminar las proteínas unidas de manera inespecífica. Después, se eluyó con tampón dietilamina 0,1 M pH 11,5 y se recogieron fracciones de 400 µl que se mezclaban con

200 µl de Tris-ClH 1M pH 7, para neutralizar el pH de la dietilamina. Tras recoger 100 fracciones, se empleó el protocolo de regeneración de la columna con lavados alternos de tampón acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4 y tampón Tris HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8, empleando 10 ml de tampón en cada ciclo de lavado. A continuación, se lavó con PBS y se dejó la columna con este tampón a 4°C.

La absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas se midió en el espectrofotómetro y a continuación, se determinó la concentración de CRP de las fracciones con mayores valores de absorbancia empleando el ELISA comercial.

La Figura 1 representa un esquema básico de la inmunopurificación de la CRP canina.

2.2. Cromatografía de afinidad

Siguiendo las recomendaciones de Pontet et al., (1978) para la purificación de CRP humana mediante cromatografía de afinidad y el artículo de Onishi et al., (1994) para la proteína C-reactiva

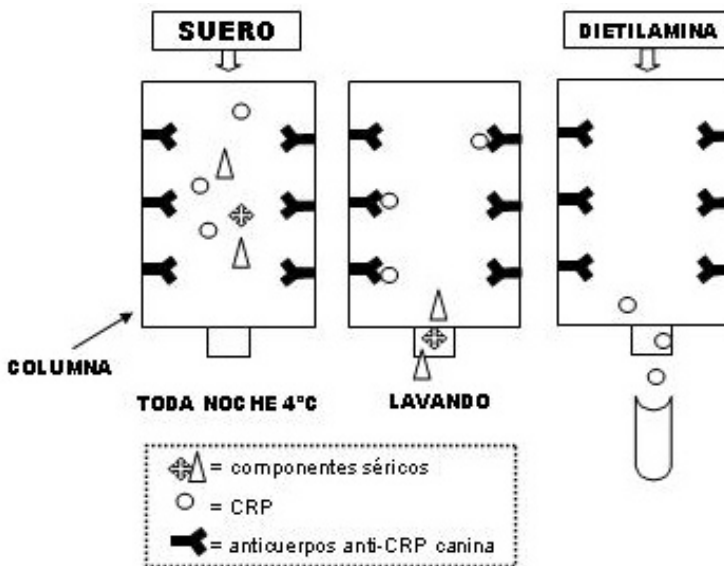


Figura 1. Representación esquemática de la inmunopurificación de la CRP canina usando anticuerpos anti-CRP canina.

tiva canina, con ligeras modificaciones aportadas por la casa comercial Sigma, se procedió al acoplamiento de fosforiletanolamina a agarosa a través de enlace epoxi. Para ello, se empleó el siguiente material:

1. Tampón de acoplamiento 0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl pH 11.
2. Tampón acetato 0,1 M, NaCl 1 M, pH 4.
3. Tampón Tris-HCl 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8.
4. Tampón de equilibrio 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,02% NaN₃, pH 8.
5. Tampón de elución 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 0,02% NaN₃, pH 8.
6. Etanolamina 1 M partiendo de etanolamina 100% (HOCH₂CH₂NH₂) (Sigma-Aldrich, España).
7. Agarosa epoxi activada (Sigma-Aldrich, España).
8. o-fosforiletanolamina_(C₂H₈NO₄P) (Sigma-Aldrich, España).
9. Columna de plástico (NAP-10 de Amersham Biosciences vacía).

En primer lugar se pesó 1g de agarosa epoxi activada al que se le añadieron 45 ml de agua destilada y se dejó toda la noche a 4°C para su completa hidratación. A la mañana siguiente, el gel se pasó a una columna NAP-10 vacía y se lavó con 55 ml de agua destilada, y a continuación con 50 ml de tampón de acoplamiento. Seguidamente, la agarosa se fue cambiando a un matraz, mediante el lavado de la columna con 20 ml de tampón de acoplamiento. Cuando la resina se depositó en el fondo del matraz, se retiró el máximo posible del tampón (quedaron aproximadamente 4 ml), añadiendo a continuación 0,1 g de fosforiletanolamina disueltos en 5 ml de tampón de acoplamiento. La decisión de emplear este volumen se basó en que la relación gel:ligando debe ser 1:2 y como sabíamos por el fabricante que 1g de gel se expande hasta un volumen de 3 ml, calculamos que la fosforiletanolamina debía ir disuelta en un volumen

máximo de 6 ml. El matraz se tapó con parafilm y se dejó en un incubador a 30°C con agitación continua a 280 r.p.m. durante 22 horas.

Al día siguiente se volvió a montar la columna, en la que se vertió la resina del matraz mediante lavados del mismo con unos 75 ml de tampón de acoplamiento. Seguidamente se añadieron 5 ml de etanolamina 1 M pH 9,4 para bloquear los grupos activos restantes de la agarosa y se dejó toda la noche en agitación continua en cámara fría a 4°C. A partir de este momento todas las operaciones fueron realizadas a esta temperatura.

El cuarto día se dejó eluir la etanolamina de la columna, se lavó con 20 ml de tampón de acoplamiento y se comenzó a regenerar la columna con lavados alternos de tampón acetato 0,1 M, NaCl 1 M, pH 4 y tampón Tris-HCl 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8. Se llevaron a cabo tres ciclos de lavado de 20 ml con cada uno de los tampones. Posteriormente, se lavó con 50 ml de agua destilada y a continuación con 20 ml de tampón de equilibrio. Se dejó tres horas con unos 5 ml de este tampón, tras las cuales se volvió a lavar con 50 ml del tampón, dejando la resina toda la noche con el mismo.

El quinto día, siguiendo el protocolo de Onishi et al., (1994), se lavó con 20 ml de tampón de equilibrio, se dejó la columna prácticamente seca y se añadieron 3 ml de suero de fase aguda diluidos en 2 ml de tampón de equilibrio. Esta solución se hizo pasar 3 veces por la columna, de manera que el eluido que iba saliendo de la misma por gravedad, se iba recogiendo en un tubo de Falcon y se volvía a depositar en la columna. Seguidamente se lavó con 40 ml de tampón de equilibrio empleando una bomba de infusión (Econo pump), ajustada a un colector de fracciones (Biorad Model 2110 Fraction Collector), con un flujo de 0,4 ml/min. Se recogieron 40 fracciones de 31 gotas en el colector, el equivalente a 0,8 ml aproximadamente. A continuación se lavó con 20 ml del tampón de elución, recogiendo fracciones de 25 gotas. A las fracciones recogidas se les determinó la absor-

bancia a 280 nm y posteriormente se empleó el ELISA comercial para medir la concentración de CRP de aquellas fracciones que presentaron valores de absorbancia más elevados.

Con objeto de emplear la columna en purificaciones posteriores se procedió a su regeneración. Para ello, primero se lavó extensamente con tampón de equilibrio (50 ml) y después con agua. Seguidamente se realizaron lavados alternos de tampón acetato 0,1 M, NaCl 1 M, pH 4 y tampón Tris-HCl 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8, de nuevo 20 ml de cada uno. A continuación se lavó con 50 ml de agua y finalmente con 20 ml de tampón de equilibrio, dejándola con este tampón lista para una nueva purificación.

3. RESULTADOS

3.1. Inmunopurificación de CRP

Un volumen de 3,5 ml de suero canino de fase aguda se diluyeron con 1,5 ml de tampón PBS y se añadieron a la matriz de sefarosa-

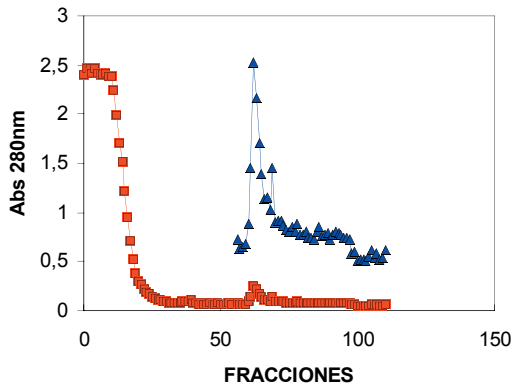


Figura 2. Perfil de elución de la CRP canina de la columna de inmunoafinidad. Los valores de absorbancia (Abs) de las fracciones eluidas de la columna de inmunoafinidad de anticuerpos policlonales anti-CRP canina se indican el eje de ordenadas y las fracciones recogidas en el eje de abscisas. En color azul se muestra aumentada la zona del pico de absorbancia comprendido entre las fracciones 60 y 70.

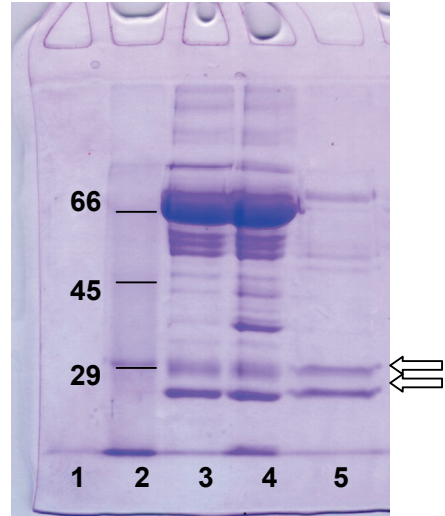


Figura 3. Pureza de las fracciones obtenidas de la columna de inmunoafinidad. Suero de perro clínicamente sano (calle 3), suero canino de fase aguda (calle 4) y fracción número 62 (calle 5) se sometieron a electroforesis reductora desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). El tamaño de las bandas se calculó de acuerdo al tamaño de proteínas de conocido peso molecular (BSA de 66 kDa, ovoalbúmina de 45 kDa y anhidrasa carbónica de 29 kDa).

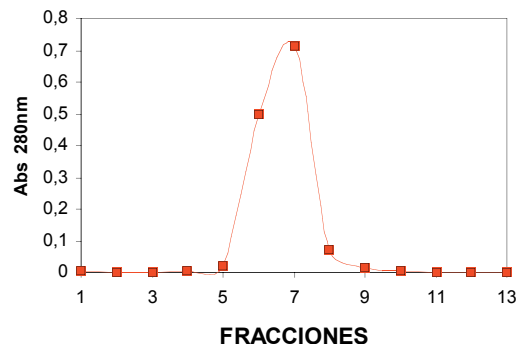


Figura 4. Perfil de elución de CRP canina mediante una columna de PEA-agarosa. La proteína fue eluida con Tris-HCl 10mM conteniendo NaCl 150 mM, EDTA 2 mM y NaN_3 0,02%, pH 8.

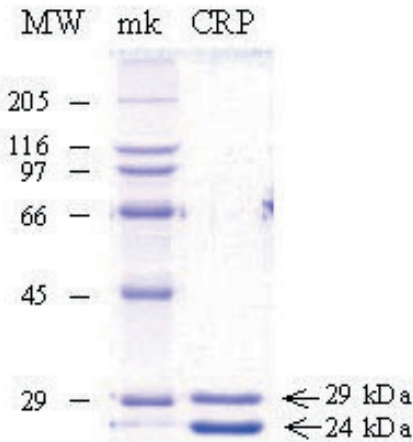


Figura 5. SDS-PAGE de la CRP purificada a partir de suero de fase aguda canino mediante cromatografía de afinidad. Los marcadores de peso molecular empleados fueron: miosina (205 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa B (97 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

antiCRP. La mezcla se incubó 16 horas a 4°C en agitación continua.

La cantidad de CRP canina unida a la matriz, según la valoración con el ELISA comercial de Tridelta, se acercó a 165 μ g (un 41% de la CRP incluida en la columna de inmunoafinidad).

La elución con dietilamina pH: 11,5 se recogió en fracciones de unos 400 μ l a los que se añadieron 200 μ l de tampón Tris-ClH 1 M pH: 7. Se midió la absorbancia a 280 nm y se obtuvo el perfil de elución que se representa en la Figura 2.

Es evidente que tras comenzar la elución con dietilamina aparece un pequeño pico de absorbancia que tiene su inicio en la fracción 60 y termina en la fracción 70 aproximadamente. Para comprobar que el pico de absorbancia correspondía a la proteína purificada se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 3), que incluía en una de sus calles (n° 5) la fracción 62, de máxima absorbancia.

Los resultados indican (Figura 3, calle 5) que la columna de inmunoafinidad es útil para la purificación de la CRP canina y que ésta presenta dos bandas de 28 y 24 kDa, respectivamente (flechas blancas). No obstante, la proteína obtenida no es 100% pura según se desprende de la presencia de bandas de mayor masa molecular. En lo que respecta al rendimiento de la columna, éste fue del 12,3%.

3.2. Cromatografía de afinidad




La proteína fue eluida de la columna de PEAE-agarosa en un solo pico que fue detectado midiendo la absorbancia a 280 nm de las distintas fracciones. Los valores de absorbancia obtenidos aparecen en la Figura 4.

Las fracciones con mayor concentración de proteína (fracción 6=162 μ g y fracción 7= 293 μ g), se unieron y se sometieron a electroforesis disociante en gel de poliacrilamida al 10% (Figura 5). En el gel se pueden apreciar dos bandas definidas con un peso molecular de 29 y 24 kDaltons respectivamente, sobre un fondo claro que descarta la presencia de impurezas. El rendimiento de la columna fue del 98%.

4. DISCUSIÓN

En medicina humana y desde hace años, algunas pruebas para la determinación de PFAs están estandarizadas y son empleadas de forma rutinaria para la evaluación de los pacientes. Así, la proteína C-reactiva se ha utilizado para diferenciar infecciones bacterianas de infecciones víricas. Por ejemplo, las meningitis bacterianas cursan con valores elevados de CRP mientras que en las víricas ésta apenas es evidente (Peltola, 1982). Las neumonías víricas y bacterianas también pueden ser diferenciadas en función de los niveles de CRP (McCarthy et al., 1978). Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado la utilidad de la CRP en la prevención y el diagnóstico temprano de enfermedades cardiovasculares (De Winter et al.,

Cuadro 1. Causas de incremento en las concentraciones de CRP canina

CAUSAS INCREMENTO CRP Ejemplos	
TRAUMA QUIRÚRGICO 	Cirugía ortopédica Implante aórtico Ovariohisterectomía Gastrotomía
INFECCIONES 	<i>Escherichia coli</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Trypanosoma brucei</i> Parvovirus <i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Ehrlichiosis Leishmaniosis Babesiosis
OTRAS INFLAMACIONES	Hepatitis, nefritis, prostatitis, peritonitis Enfermedad intestinal inflamatoria Pancreatitis Piometra
INYECCIÓN AGENTES INERTES 	Aceite mineral Polvos de talco Caseína Trementina Ácido acetilsalicílico
TUMORES	Tumores mamarios Tumores superficiales
GESTACIÓN	

2000), así como en la predicción de enfermedad arterial periférica o aterosclerosis sistémica (Ridker, 2001).

En la clínica canina la cuantificación de la CRP puede ser un parámetro analítico de rutina en un futuro cercano. Sin embargo, actualmente los métodos comerciales para la cuantificación de la proteína canina no son precisos y su coste es elevado. Una opción que abarataría los costes de la determinación de la CRP canina, sería el uso de ensayos de la CRP humana, con el

requisito de que los estándares y calibradores sean de la especie donde se van a realizar los análisis (Cerón et al., 2005). Es por esto que el objetivo primero de nuestro estudio fue desarrollar un método sencillo y rentable para purificar la CRP canina.

En el presente trabajo la proteína C-reactiva canina fue purificada recurriendo a dos metodologías:

- La **inmunopurificación** usando anticuerpos policlonales anti-CRP canina, que permitió

purificar la proteína canina. Ésta fue eluida de la columna en un único pico de absorbancia cuya electroforesis en gel de poliacrilamida mostró dos bandas nítidas con un peso molecular aproximado de 28 y 24 kdaltons. El peso molecular de la proteína coincidió con el publicado por otros autores (Caspi et al., 1984; Onishi et al., 1994). Sin embargo, la proteína aislada mediante esta técnica no fue 100% pura, ya que en el gel también se apreciaron algunas impurezas de elevado peso molecular.

- La **cromatografía de afinidad** mediante PEAE-agarosa, que proporcionó una proteína virtualmente pura. La SDS-PAGE de la proteína purificada mostró dos únicas bandas; una de 29 y otra de 24 kDa, coincidiendo con los estudios publicados con anterioridad e indicando que la proteína aislada correspondía a la CRP canina.

La presente técnica fue descrita por Onishi et al., (1994) quienes emplearon una columna de PEAE-agarosa comercial, suministrada por la casa comercial Sigma. En el momento de comenzar nuestro estudio sobre la CRP canina, esta columna había sido retirada del mercado, por lo que tuvimos que realizar el acoplamiento de la fosforiletanolamina a la agarosa, basándonos en indicaciones suministradas por la casa comercial Sigma y en el artículo de Pontet et al., (1978) sobre purificación de la CRP humana mediante cromatografía de afinidad.

Si comparamos la cromatografía de afinidad con la inmunopurificación hay que señalar que la proteína obtenida mediante la primera técnica se ajusta más a las propiedades necesarias para su uso como estándar de calibración ya que está libre de impurezas. Otra ventaja de la cromatografía de afinidad sobre la inmunopurificación es su precio, mucho más asequible al no requerir el empleo anticuerpos, reactivos de coste elevado. El rendimiento de la columna de afinidad (prácticamente del 100% frente al 12,3 % de la columna de inmunofinidad) y su estabilidad tras los procesos de regeneración son también argumentos para recomendar su uso en la purificación de la CRP canina. La proteína

así purificada podrá ser empleada como estándar en inmunoensayos o como inmunógeno de cara a la obtención de anticuerpos dirigidos contra la CRP canina.

REFERENCIAS

- Bharadwaj D., Stein M.P., Volzer M., Mold C., Du Clos T.W. 1999. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fc γ receptor II. *J. Exp. Med.* 190: 585-590.
- Caspi D., Baltz Marilyn L., Snel F., Gruys E., Niv D., Batt R.M., Munn E.A., Buttress N., Pepys M.B. 1984. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology.* 53: 307-313.
- Cerón J.J., Eckersall P.D., Martínez-Subiela S. 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Pathol.* 34: 85-99.
- De Winter R.J., Fischer J., Bholasingh R., van Straalen J.P., de Jong T. 2000. C - reactive protein and cardiac troponin T in risk stratification: differences in optimal timing of tests early after the onset of chest pain. *Clin. Chem.* 46: 1597-1603.
- Eckersall P.D., Conner J.G., Parton H. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein. *Vet. Rec.* 124: 490-491.
- Eckersall P.D. 1995. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Comp. Haematol. Int.* 5: 93-97.
- Eckersall P.D. 2000. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Rev. Med. Vet.* 151: 577-584.
- Fujise H., Takanami H., Yamamoto M., Ohta I., Yamamoto S., Fukase T., Naiki M., Akihama S., Ogawa E., Takahashi R. 1992. Simple Isolation of Canine C-Reactive Protein (CRP) by Phosphorylcoline (PC) Affinity Chromatography. *J. Vet. Med. Sci.* 54: 165-167.
- Gershov D., Kim S., Brot N., Elkou K.B. 2000. C-reactive protein binds to apoptotic cells,

- protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* 192: 1353-1363.
- Kjelgaard-Hansen M., Kristensen A.T., Jensen A.L. 2003a. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of c-reactive protein in canine serum. *J. Vet. Med. A* 50: 164-168.
- Kjelgaard-Hansen M., Jensen A.L., Kristensen A.T. 2003b. Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Vet. Clin. Pathol.* 32: 81-87.
- Kjelgaard-Hansen M. 2004. Canine C-reactive protein. A study on the applicability of canine serum C-reactive protein. *Veterinary Clinical Pathology*. Department of Small Animal Clinical Sciences. Tesis Doctoral. The Royal Veterinary and Agricultural University. Frederiksberg, Dinamarca.
- Kushner I., Gewurz H., Benson M.D. 1981. C-reactive protein and the acute phase response. *J. Lab. Clin. Med.* 97: 739-749.
- Martínez-Subiela S., Tecles F., Eckersall P.D., Cerón J.J. 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet. Rec.* 150: 241-244.
- McCarthy P.L., Frank A.L., Ablow R.C., Masters S.J., Dolan T.F. Jr. 1978. Values of the C-reactive protein test in the differentiation of bacterial and viral pneumonia. *J. Pediatr.* 92: 454-456.
- Onishi T., Shimizu T., Kajikawa T. 1994. Simple and Efficient Purification of C-reactive Protein from Canine Serum. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 417-419.
- Peltola H.O. 1982. C-reactive protein for rapid monitoring of infections of the central nervous system. *Lancet North Am. Ed.* 1: 980-982.
- Pontet M., Engler R., Jayle M.F. 1978. One step preparation of both human C-reactive protein and CIt. *FEBS Lett.* 88: 172-175.
- Ridker P.M. 2001. Role of inflammatory biomarkers in prediction of coronary heart disease. *Lancet North Am. Ed.* 358: 946-948.
- Riley R.F., Coleman M.K. 1970. Isolation of C-reactive proteins of man, monkey, rabbit and dog by affinity chromatography on phosphorylated cellulose. *Clin. Chim. Acta.* 30: 483-496.
- Riley R.F., Zontine W. 1972. Further observations on the properties of dog C-reactive protein and the C-reactive protein response in the dog. *J. Lab. Clin. Med.* 80: 698-703.
- Solter P.F., Hoffmann W.E., Hungerford L., Siegel J.P., St. Denis S.H., Dorner J.L. 1991. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *A.J.V.R.* 52: 1738-1742.
- Volanakis J.E. 1982. Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 389: 235-250.
- Yamamoto S., Abe N., Santsuka H., Shida T., Kishida K., Kuwajima S., Yamada M., Morimatsu M., Naiki M. 1993. Efficient preparation of monospecific anti-canine C-reactive protein serum and purification of canine C-reactive protein by affinity chromatography. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 36: 293-301.

