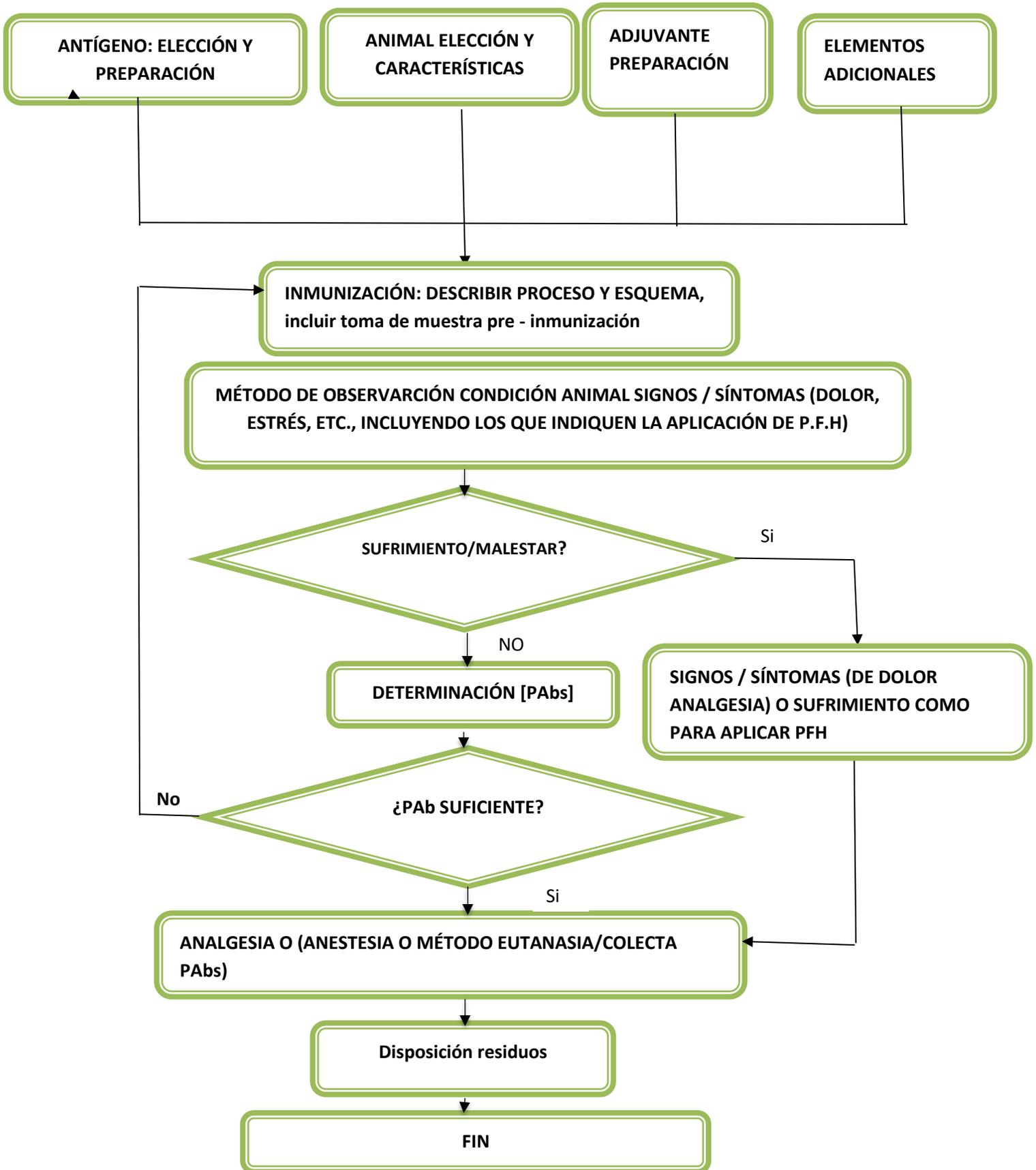


Esta es una guía que debe ser modificada con la información particular de cada proyecto/procedimiento de grupo y debe ser sometida a evaluación del COMITÉ DE BIOÉTICA.

Indicar qué tipo de: PROCEDIMIENTO PARA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES (pAbs)



Esta es una guía que debe ser modificada con la información particular de cada proyecto/procedimiento de grupo y debe ser sometida a evaluación del COMITÉ DE BIOÉTICA.

PRESENTACIÓN:

Esta es una guía elaborada y revisada por el COMITÉ DE BIOÉTICA del Instituto de Biotecnología, sometidos a revisión de los líderes académicos, se agradece la revisión y comentarios de la Q.F.B. Rafaela Espinosa Organista.

Esta guía puede ser utilizada para someter este procedimiento a evaluación del Comité, se debe modificar para el caso que se somete a revisión.

CUADRO 1. GUIA DEL PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Notas: No se permite la administración de sustancias en el cojinete plantar, ni en ganglios. La ruta IP no es recomendada para producción de anticuerpos policlonaes, por probables efectos de peritonitis, o cambios de comportamiento.

ES FUNDAMENTAL MINIMIZAR MOLESTIAS A LOS ANIMALES por lo que se recomienda consultar al personal de la Unidad de Bioterio, en caso de requerir analgesia.

ACCIÓN	OBSERVACIONES
PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO (Ag)	Indicar procedencia y método de preparación de los antígenos para lograr la mayor pureza. Observar que haya un control del pH a nivel fisiológico. Mantener condiciones de esterilidad durante la preparación de la mezcla de antígeno e indicar la cantidad a usar. Si el antígeno es una toxina o cualquier otra sustancia tóxica para el animal, se debe justificar su uso, indicando cuáles serían los síntomas patológicos que pudieran presentarse durante el proceso de inmunización y cuáles los parámetros para la determinación del punto final humanitario (PFH).
ELECCIÓN Y MANEJO DEL ANIMAL	Indicar: número animales, especie, edad. Garantizar la capacitación y experiencia del personal del proyecto encargado de esta parte (NO del personal de la U. DE BIOTERIO), en la manipulación de animales de laboratorio, inoculación, toma de muestras, observación y valoración del estado de salud del animal para evitar estrés, dolor. etc. Indicar con el detalle necesario, el lugar y condiciones en los que se mantendrán a los animales. Los más usados en U.B. del IBt, ejemplo: Ratón – cuando se requiere poco pAb; rata – ANTI-RATÓN o IgE; más usado conejo (hasta 250mg de pAb). También se han usado gallinas (250mg/huevo, anti-mamíferos).
ELECCIÓN DEL ADYUVANTE	Usar adyuvante INCOMPLETO de Freund y/o sales de aluminio (ver recomendaciones y esquema inmunización), si usa otros adyuvantes: Justificar y ver http://www.ibt.unam.mx/server/PRG.base?alerno:0,clase:betica,tit:Recommendatioclase:betica,tit:Recommendations for Use and Alternatives to Freund's Complete Adjuvant,tipo:doc,edi:d,dir:bio_e_alternativas_freunds.html,pre:betica .
ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN	Describir ruta, periodicidad y volumen de administración de sustancias, Núm. sitios, volumen/por sitio, fecha de suministro, peso del animal, etc. (ver CCA, 2002, APPENDIX B) (ejemplo Cuadro 2).

Esta es una guía que debe ser modificada con la información particular de cada proyecto/procedimiento de grupo y debe ser sometida a evaluación del COMITÉ DE BIOÉTICA.

ACCIÓN	OBSERVACIONES
OBSERVACIÓN Y CUIDADO DE LOS ANIMALES	Resumir y determinar método de observación de estado del animal, medidas para disminuir malestar y/o enfermedad y signos/síntomas que determinarán finalizar experimento PFH. Incluir el uso de analgésicos para disminuir el dolor de los animales, en caso necesario. Es indispensable la observación diaria, vigilar el consumo de agua y alimento, etc.
SEDACIÓN/ANALGÉSICOS	Indicar uso de sedantes, analgésicos, anestésicos vía de administración, volumen, según la especie (ver Reglamento del Comité de Bioética http://ibt.unam.mx/computo/pdfs/ReglamentoComiteBioeteicaAprobadoCI.pdf).
EUTANASIA	Describir método a utilizar, Y CÓMO SE OBTIENEN LOS ANTICUERPOS
RESIDUOS	Indicar la forma en que serán almacenados/dispuestos los distintos productos/residuos

NOTAR QUE:

En caso del uso de sustancias tóxicas o patógenos (Grupo de Bioseguridad 2 o mayor), indicar medidas de bioseguridad / seguridad y anexar Manual de bioseguridad (revisado por la Comisión Interna de Bioseguridad del IBT), con firma de capacitación de los participantes.

Es importante que la mezcla adyuvante/inmunógeno se pueda inyectar fácilmente y en volúmenes lo más bajos posible, para evitar sufrimiento de animales. Si fuera posible y/o necesario, se sugiere usar emulsificantes.

Está permitido que para inmunógenos que sean moléculas pequeñas se utilice en la primera aplicación ACF vía SC (no ID ni IM) bajo condiciones asépticas y evitando derrames, así como indicar proceso y cuidado del animal.

Solo se puede usar el mismo sitio de la primera inmunización o uno cercano, siempre y cuando NO haya reacción inflamatoria.

Esta es una guía que debe ser modificada con la información particular de cada proyecto/procedimiento de grupo y debe ser sometida a evaluación del COMITÉ DE BIOÉTICA.

CUADRO 2. ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

NOTAS:

La colección de suero pre-inmune debe ser de máximo el 10% del volumen de sangre del animal (Leenaars, *et al.*, 2005). Dependiendo del peso del animal, sería aproximadamente para conejos 15 ml, rata 2 ml y en el caso del ratón 0.3 ml.

La 1ª Inoculación con Adyuvante Incompleto de Freund o sales de aluminio (fosfato o hidróxido de aluminio ver Gupta y Rost, 2000). Una relación 1/1, V/V de antígeno/adyuvante, subcutánea (SC). En el CCAC (2002) se pueden consultar los volúmenes máximos que se pueden inyectar.

En la 2ª. Inoculación es posible aplicar soluciones de antígeno-sales de aluminio (como adyuvante).

Agregar un esquema de inmunización, que incluya cuando menos la información sobre:

- A) **CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN:**
 - A.1) ANTÍGENO usado (ejemplos: µg de toxina, proteína, etc.)
Puede agregar una columna si se usan en cada aplicación cantidades diferentes de antígeno.
 - A.2) adyuvante (ml de AIF)
 - A.3) ml de solución (ejemplo sol. salina PBS)
- B) Vía de administración (ejem. IM, SC, IP, ETC.)
- C) Núm. de sitios de aplicación
- D) Volumen total aplicado por sitio de la solución A.
- E) Peso del animal, si se determina en una o más aplicaciones
- F) Las demás que considere importante anotar u “observaciones”

INDICAR AQUÍ QUÉ CONCENTRACIÓN (A) TIENE LAS SOLUCIONES A INYECTAR (SI HAY VARIACIÓN DE OTRO COMPONENTE ADEMÁS DEL ANTÍGENO, AGREGAR UNA COLUMNA.

INDICAR VÍA DE ADMINISTRACIÓN: SI ES SC (CUÁNTOS SITIOS) U OTRA VÍA, SI HAY VARIACIONES NECESARIAS EN CADA APLICACIÓN AGREGUE UNA COLUMNA

CUADRO 2. ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN /TOMA DE MUESTRA (ANIMAL)

****Si las unidades de solvente son las mismas; así como cantidad de adyuvante se puede indicar en esta sección (fuera del cuadro) y sólo poner en la tabla las unidades del antígeno si es variable.**

NÚM. ADMINIS TRACIÓN	(DÍA)	PROCEDIMIENTO	Unidades ANTÍGENO (µl de toxina, proteína, etc.) U. de adyuvante (ml, g, etc. nombre del adyuvante) / Vol. solvente (ejem. solución salina) **	PESO ANIMAL (Unidad) (Inicial y cuando sea necesario)	OBSERVACIONES
0	DIA 1	Colección suero pre-inmune (nota: máximo entre el 7.5% y 10% del volumen total de sangre del animal (1% del peso, Leenaars, et al, 2005).	--		
1		Primera inoculación			
2	Entre sem. 2 a 4	Segunda inoculación			

Esta es una guía que debe ser modificada con la información particular de cada proyecto/procedimiento de grupo y debe ser sometida a evaluación del COMITÉ DE BIOÉTICA.

3	Sem 4 a 6	Tercera inoculación			
T (n)	Toma de muestra para determinar concentración de pAbs				
T final	Anestesia y eutanasia				

Las rutas de inyección, vols. máximos, etc. se pueden consultar en Apéndices de CCA, 2002.

BIBLIOGRAFÍA UTILIZADA EN LA ELABORACIÓN DE ESTA GUÍA POR EL COMITÉ DE BIOÉTICA Fecha consulta 26 septiembre 2024

Antibody Generation: Producing Monoclonal Antibodies Using Hybridomas, <https://app.jove.com/v/10499/antibody-generation-producing-monoclonal-antibodies-using-hybridomas>, Consultado 26 de septiembre 2024

(CCAC) Canadian Council on Animal Care. Guidelines: on antibody production. 2002. https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf

Blood sampling: Rabbit, Marginal ear vein/artery, Technique, <https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling/blood-sampling-rabbit>

Gupta, R. and B. E. Rost. 2000. Aluminum Compounds as Vaccine Adjuvants, Methods in molecular medicine, https://www.researchgate.net/publication/264496939_Aluminum_Compounds_as_Vaccine_Adjuvants

Leenaars, Marlies, Coenraad F. M. Hendriksen. 2005. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations, ILAR Journal, 46, 3, <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/46/3/269/739081>

Meyer N, Kröger M, Thümmel J, Tietze L, Palme R, Touma C. Impact of three commonly used blood sampling techniques on the welfare of laboratory mice: Taking the animal's perspective. PLoS One. 2020 Sep 8;15(9):e0238895. doi: 10.1371/journal.pone.0238895. PMID: 32898190; PMCID: PMC7478650.

Parasuraman, S., R. Raveendran y R. Kesavan. 2010. Blood sample collection in small laboratory animals. Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics, 1(2): 87 <http://www.jpharmacol.com/article.asp?issn=0976-500X;year=2010;volume=1;issue=2;spage=87;epage=93;aulast=Parasuraman>

Turner, P.V., T. Brabb, C. Pekow and M.A. Vasbinder. 2011. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 50: 600-613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189662/>

Harlow, Ed and David Lane, 1988, Antibodies a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (Capt. 5 y 6)

Raabe, Brigitte M., James E. Artwohl, Jeanette E. Purcell, Jamie Lovaglio, and Jeffrey D. Fortman, 2011, Effects of Weekly Blood Collection in C57BL/6 Mice, J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci., 50(5): 680-685.

Esta es una guía que debe ser modificada con la información particular de cada proyecto/procedimiento de grupo y debe ser sometida a evaluación del COMITÉ DE BIOÉTICA.

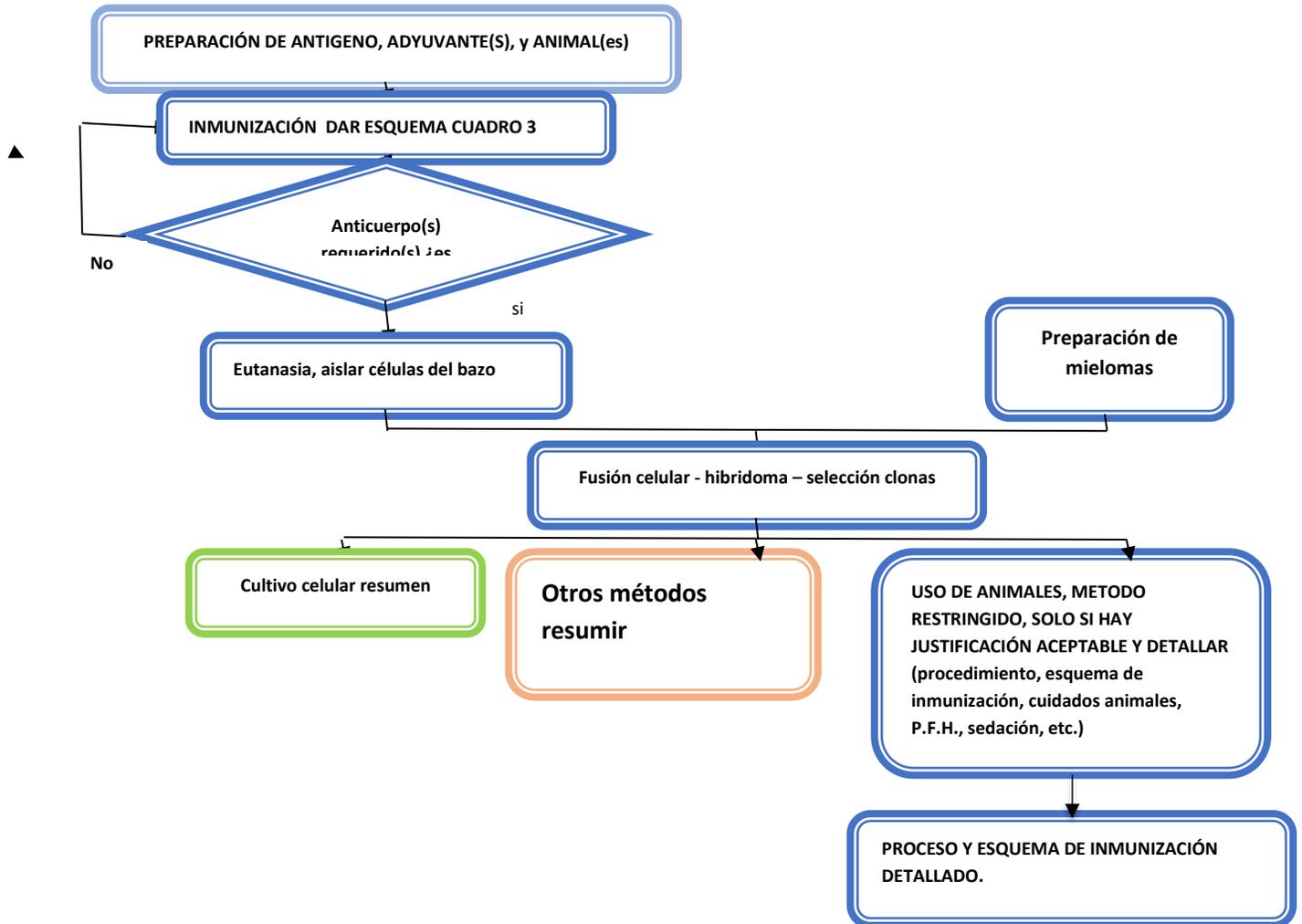
NOTA:

Agregue sus propias referencias, las que haya consultado para su procedimiento específico.

Esta es una guía que debe ser modificada con la información particular de cada proyecto/procedimiento de grupo y debe ser sometida a evaluación del COMITÉ DE BIOÉTICA.

PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR PARA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

MONOCLONALES (mAbs)



Esta es una guía que debe ser modificada con la información particular de cada proyecto/procedimiento de grupo y debe ser sometida a evaluación del COMITÉ DE BIOÉTICA.

INDICACIONES GENERALES

Verificar y justificar CON EVIDENCIA SI ES QUE NO se pueden obtener los mAbs comercialmente. Para la evaluación del procedimiento por parte del Comité de Bioética del IBt/UNAM, se debe presentar INFORMACIÓN DETALLADA DE PROCEDIMIENTO (Incluyendo medidas para reducir dolor - incomodidad de animales, condiciones de mantenimiento, observación, esquema de inoculación (Cuadro 3 -primera parte del proceso- y, en su caso el Cuadro 4).

Etapas para la producción:

- 1) **PRIMERA ETAPA.** Inducción de la producción de anticuerpos en las células B *in vivo* por inmunización, y la selección de hibridomas *in vitro*.

CUADRO 3. PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (mAb) PRIMERA ETAPA

Ejemplo de un esquema de inmunización para 1 ratón BALB/c, normalmente se usan 6 ratones hembra.

**Si vol. Adyuvante y/o solvente son constantes indicarlo aquí fuera de cuadro, y dejar sólo en la columna las unidades del antígeno (variable); así como el caso de la vía de administración, Núm. de sitios (ya no sería necesaria una columna en el cuadro.

NÚM. ADMINISTRACIÓN	(DÍA)	PROCEDIMIENTO	Unidades ANTÍGENO/ Unidades de Adyuvante unidades + unidades de volumen solvente)**	Vía de adomon., vol. Admon. (#sitios)**	PESO ANIMAL (Unidad) cuando sea requerido	OBSERVACIONES
	DIA 1	Colección SUERO pre-inmune (máximo 10% del Vol. de sangre total, o aprox. 1% del peso)	--	Ejemplo:VEN A CAUDAL		
1		Primera inmunización. Mantener condiciones de esterilidad durante la preparación de la mezcla de antígeno, e indicar la cantidad a usar	UNIDADES (µl o µg) del Antígeno (toxina, péptido, etc.) + UNIDADES DE ADYUVANTE (NOMBRE, ejemplo AIF) (ml O g) / Unidades de sol. buffer (nombre) y unidades (ml)	EJEMPLO: IP, 500 µl (1 sitio)		
2	Día 15	Segunda inmunización		EJEMPLO: vía IP 500 µl (1 sitio)		
	Día 24	Toma de muestra		V. CAUDAL		
3	Día 35	Tercera inmunización		IP		
	Día 45	Toma de muestra				

Esta es una guía que debe ser modificada con la información particular de cada proyecto/procedimiento de grupo y debe ser sometida a evaluación del COMITÉ DE BIOÉTICA.

NÚM. ADMINISTRACIÓN	(DÍA)	PROCEDIMIENTO	Unidades ANTÍGENO/ Unidades de Adyuvante unidades + unidades de volumen solvente)**	Vía de adomn., vol. Admon. (#sitios)**	PESO ANIMAL (Unidad) cuando sea requerido	OBSERVACIONES
4	Día 56	inmunización				
	Día 59	Anestesia y Eutanasia, obtención de anticuerpos (decir cómo)				
	DIA N	obtención de bazo, etc.				

FUENTE: Harlow, Ed and David Lane, 1988: 151.

Resumir el procedimiento para la obtención de células B, fusión con mieloma y obtención de hibridomas para la siguiente etapa

SEGUNDA ETAPA: Propagación de hibridomas:

2.1) *in vitro*: en cultivo de hibridomas en caldo de cultivo, describir brevemente el procedimiento.

2.2) Otros métodos como las técnicas de expresión de proteínas recombinantes, que pueden ser producidas en animales modificados genéticamente (debe hacerse también con base en lineamientos internacionales y describir procedimiento para ser evaluado), o tecnología de bibliotecas de fagos (phage display techniques), ver <https://app.jove.com/t/22082/production-and-purification-of-recombinant-antibodies-from-mammalian-cells>

2.3) *in vivo*, **MÉTODO RESTRINGIDO**, porque se produce dolor y estrés a los animales, se revisará detalladamente y sólo se podrá aprobar si su uso está ampliamente justificado y respaldado con evidencias y con descripción del proceso detallado (condiciones para manejo de los animales, esquema de inmunización, determinación de punto final humanitario, etc.). **Los procesos deben ser desarrollados por personal muy capacitado y experto en el proceso, debe haber observación diaria de los animales, por personal capaz de reconocer los signos de estrés, y los del PFH, limitar, en lo posible, el número de toma de muestras (3 o 4), etc.**

ESTE MÉTODO DEBE SER sometido a evaluación del Comité de Bioética debe detallar el procedimiento. Ver Guidelines for Monoclonal Antibody Production in Mice, https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b10_ascites_guide_archive.pdf, que entre otras cosas indica que:

“Se requiere el uso de un agente “condicionador” común como el Pristane; el Adyuvante Incompleto de Freund (FIA) también ha demostrado ser un agente condicionador eficaz. Se ha reportado la preocupación por la incomodidad y angustia que puede estar asociado con los agentes “condicionadores”, particularmente Pristane. Debido a esta preocupación, varios investigadores han sugerido usar una dosis menor de 0.1 a 0.2 ml de Pristane. El ILAR, señala que para algunas cepas de ratones un volúmen de 0.2 ml podría no ser suficientes para producir ascitis y que se podría requerirse hasta 0.5 ml. Por todo lo anterior se recomienda el uso de las dosis más bajas de agentes condicionadores .

Las suspensiones celulares deben prepararse de acuerdo con las Guías de la ARAC (<https://oacu.oir.nih.gov/animal-research-advisory-committee-arac-guidelines>). El número de células de

Esta es una guía que debe ser modificada con la información particular de cada proyecto/procedimiento de grupo y debe ser sometida a evaluación del COMITÉ DE BIOÉTICA.

hibridoma inoculadas y el volumen de inóculo suelen oscilar entre 10^5 y 10^7 células en volúmenes de 0.1 a 0.5 ml respectivamente, pero pueden variar según la línea de hibridoma. El intervalo de tiempo estándar entre la preparación y la inoculación de células de hibridoma es de 10 a 14 días. En general, un mayor número de células se asocia con una mayor morbilidad y un número menor a 1×10^5 células puede provocar menos tumores ascíticos.

Una vez que se inyectan las células de hibridoma, los animales deben ser monitoreados al menos una vez al día, siete días a la semana, por personal familiarizado con los signos clínicos asociados con la producción de ascitis.

La presión de la ascitis debe aliviarse antes de que la distensión abdominal sea lo suficientemente grande como para causar malestar o interferir con la actividad normal. Se puede utilizar restricción manual y anestesia para la paracentesis abdominal (peritoneocentesis o paracentesis). La paracentesis debe ser realizada por personal capacitado utilizando la técnica aséptica adecuada. Se debe utilizar la aguja más pequeña posible que permita un buen flujo (calibre 18-22). El líquido debe extraerse lentamente y dejar gotear desde el centro de la aguja en lugar de aspirarlo.

Los animales deben ser monitoreados con frecuencia durante varias horas después de la punción para observar complicaciones, incluidos signos de shock debido a la extracción de líquidos. Hacer si es necesario una reposición preventiva de líquidos con 1 a 2 ml de solución salina estéril tibia administrada por vía subcutánea antes de la punción o por vía intraperitoneal inmediatamente después de la punción puede aliviar algunas complicaciones, especialmente en animales a los que se les realizará más de una punción.

Los animales deben seguir siendo monitoreados al menos una vez al día, siete días a la semana por personal familiarizado con los signos clínicos asociados con la producción de ascitis, shock circulatorio, dolor y angustia. Los ojos, oídos y hocico pálidos y las dificultades para respirar son indicativos de shock circulatorio. Los signos de dolor o angustia también pueden incluir postura encorvada, pelaje áspero, consumo reducido de alimentos, pérdida de peso corporal, inactividad, dificultad para caminar, problemas respiratorios y crecimiento palpable de tumores sólidos. Los animales deben ser sacrificados de inmediato si hay evidencia de paracentesis hemorrágica, shock, dolor o angustia.

El número de punciones debe ser limitado, en función de la condición del animal, y debe contar con justificación y aprobación del Comité.”

No se permite la administración de sustancias en el cojinete plantar, ni en ganglios. La vía IP no está recomendada por probables efectos de peritonitis y cambios de comportamiento, sólo debe hacerse el menor número de veces y por personal experto.

ES FUNDAMENTAL MINIMIZAR MOLESTIAS A LOS ANIMALES, por lo que se recomienda que el personal de la Unidad de Bioterio, pueda indicar si se requiere aplicar analgésicos o anestésicos.

Bibliografía utilizada por el COMITÉ DE BIOÉTICA PARA LA ELABORACIÓN DE LA GUÍA:

Ascites Production in Mice, https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b10_ascites_guide_archive.pdf

Guidelines for Ascites Production in Mice, 2014,

https://www.med.hku.hk/images/document/04research/culatr/NIH_Guidelinese_for_Ascitis_Production_in_Mice_2016.pdf

Johns Hopkins University Animal Care and Use Committee. **Monoclonal antibody production,**

Esta es una guía que debe ser modificada con la información particular de cada proyecto/procedimiento de grupo y debe ser sometida a evaluación del COMITÉ DE BIOÉTICA.

(CMPMA/ILAR/NRC) Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies, Institute for Laboratory Animals Research National Research Council, **Monoclonal Antibody Production**. National Academy Press, 1999.

<http://grants.nih.gov/grants/policy/antibodies.pdf>

Greenfield, Edward (ed), 2014, Antibodies: A Laboratory Manual, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, https://www.cshlpress.com/default.tpl?cart=156950859358932057&fromlink=T&linkaction=full&linksortby=oop_title&--eqSKUdataq=975, <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/Antibodies2/AB2Intro7Part1.pdf>

Harlow, Ed and David Lane, 1988, Antibodies a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (Lab. Arias/López).

AGREGAR LAS REFERENCIAS QUE CONSULTEN PARA SU PROCEDIMIENTO