

# ANEXO I

## DIRECTRICES GENERALES PARA LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN CONEJOS EN EL BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUIMICAS Y FARMACEUTICAS

### Introducción

La producción de anticuerpos contra antígenos específicos y no específicos es una herramienta utilizada en todos los campos de la investigación biomédica. Actualmente se obtienen anticuerpos en forma rutinaria contra una gran variedad de proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos. Muchos de estos antígenos son pequeños y poco inmunogénicos y es necesario aumentar su inmunogenicidad con adyuvantes.

Con la intención de eliminar o reducir a un mínimo las molestias en los animales utilizados para la producción de Anticuerpos policlonales se elaboran las siguientes directrices aplicables a todos los protocolos que se efectúen en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.

### Uso de adyuvantes

Durante muchos años se ha utilizado para aumentar la respuesta inmunológica el adyuvante completo de Freund (FCA) consistente en una mezcla de un aceite no metabolizable (aceite mineral) y micobacterias inactivadas. El uso del FCA puede causar reacciones granulomatosas en el sitio de inyección. A pesar de esto existe suficiente evidencia científica que justifica su utilización cuando se realiza en forma responsable y cuidadosa, de manera tal de evitar o minimizar el efecto adverso antes mencionado.

Se deberá:

- evaluar la necesidad o no de utilización del FCA, dependiendo de la capacidad inmunogénica esperada del Antígeno.
- evaluar la posibilidad de utilizar adyuvantes comerciales alternativos tales como Ribi Adjuvant Systems (RAS), Hunter's TiterMax, Montanide ISA Adjuvants, Syntex Adjuvant Formulation (SAF), Alhydrogel, Rehsorptar dependiendo de la naturaleza del Antígeno.
- utilizar a concentraciones de micobacterias menores a 0,5 mg/ml en la mezcla inyectada.
- utilizar el Antígeno en concentraciones elevadas, de manera que la emulsión sea rica en cantidad de Antígeno y se inyecte el menor volumen de emulsión posible.
- inyectar la emulsión en varios sitios.
- separar los sitios de inyección entre sí para evitar la fusión de las reacciones inflamatorias.
- realizar un máximo de 4 inyecciones por vía subcutánea
- inyectar un volumen máximo de 0.25 ml por sitio.
- utilizar el FCA sólo en la inmunización inicial, utilizándose el FIA (aceite mineral sin micobacterias) en las inyecciones subsiguientes.
- manipular el FCA con equipamiento de protección adecuado (guardapolvo, guantes, gafas, barbijo) dado que es considerado un reactivo de riesgo biológico para el ser humano.

## **Preparación del Antígeno**

- las proteínas deberán ser electroeluidas de los geles de poliacrilamida siempre que sea posible,
- si no fuera posible realizar la electroelución, los fragmentos del gel podrán ser deshidratados en frío utilizándose N<sub>2</sub> y luego molidos con mortero y pilón hasta formar un polvo fino que pase a través de una aguja de calibre 21G,
- deberán utilizarse elementos estériles, sugiriéndose la filtración de la solución a través de un filtro no adsorbtivo de 0.22 micrones para evitar la contaminación bacteriana exógena,
- deberán eliminarse los compuestos químicos utilizados en la purificación del Antígeno (SDS, urea, ácido acético, solventes y cualquier compuesto potencialmente tóxico),
- el Antígeno se solubilizará o resuspenderá en solución salina o buffer fosfato salino estéril,
- el pH de la solución deberá ser próximo a 7.

## **Emulsión Antígeno-Adyuvante**

- El envase conteniendo el FCA deberá mezclarse por inversión para asegurar la resuspensión del componente micobacteriano.
- Se utilizará el FCA en proporción 1:1 v/v.
- La emulsión se preparará cuidadosamente utilizando los elementos de bioseguridad correspondientes.
- Se deberá asegurar la formación de una emulsión estable, no debiéndose separar sus componentes cuando se deja en reposo.

## **Lugar de inyección, preparación del sitio y administración de la emulsión**

- Se evitarán las áreas que habitualmente se utilizan para la manipulación y sujeción del animal.
- El/los sitios de inyección se prepararán asépticamente, utilizando alcohol y solución de yodo povidona al 5%
- Para la inyección se utilizarán jeringas y agujas estériles descartables.
- Se utilizará una aguja de calibre suficiente (21G o mayor) para asegurar el paso suave de la emulsión viscosa. El uso de agujas de menor calibre puede provocar la separación de la misma del pico de la jeringa y el salpicado de la emulsión con el consiguiente riesgo para el operador.
- Se utilizará exclusivamente la vía subcutánea para la inyección

## **Selección del animal**

- Se utilizarán conejos de las razas New Zealand o Californian albinos adultos jóvenes de aproximadamente 3 meses de edad (peso 2,5 - 3 Kg)

## **Sujeción e inmovilización del animal**

- La inmovilización del animal se efectuará de manera tal de evitar lesiones tanto al animal como a los técnicos. Podrá utilizarse para tal fin una toalla para envolver al animal, inmovilizándolo.
- Podrá sedarse previamente al animal utilizando Acepromazina al 1% por vía oral, dosis 0,5 a 1,5 mg/ kg

## **Observación pos inyección**

- Se observará diariamente el sitio de las inyecciones para detectar lesiones tales como hinchazón, formación de abscesos, fístulas, ulceraciones y/o infecciones. Cuando sea necesario se requerirá la intervención de un profesional Veterinario para que indique la terapéutica a seguir.
- Se evaluará el estado general del animal (comportamiento, actividad, consumo de agua y comida, pérdida de peso) y la aparición de signos de sufrimiento, dolor o distress.

## **Extracción de sangre**

- Se utilizarán elementos estériles descartables. Preferiblemente se utilizará cánula de 23G (tipo butterfly) acoplada a una jeringa.
- Se realizará por punción de la arteria central de la oreja.
- No se utilizarán agentes químicos irritantes tales como xileno para lograr la vasodilatación, pudiéndose utilizar para tal fin una lámpara infrarroja
- Se extraerá un volumen de sangre dentro de los márgenes seguros (máximo 10% de la volemia, aproximadamente 20 ml) sin la necesidad de reposición de líquido.
- Se dejará descansar al animal durante 3 a 4 semanas antes de efectuar una nueva extracción.
- No se efectuarán sangrados terminales.

## **Frecuencia de los boosters**

- Se efectuarán como máximo 4 boosters, separados entre sí por al menos 4 semanas.

## **Duración del experimento**

- Se evitará la prolongación innecesaria de los protocolos. Luego de la evaluación de la respuesta generada y habiéndose comprobado la obtención de Anticuerpos con título acorde a la necesidad del investigador, se efectuarán sangrados sucesivos hasta obtener la cantidad de Anticuerpos suficiente.
- La prolongación de los protocolos por un lapso mayor de 12 meses deberá ser justificada convenientemente.

## **Eutanasia**

- Finalizado el desarrollo de anticuerpos, se procederá a la eutanasia de los animales, utilizando solución eutanásica compuesta por Pentobarbital sódico 400 mg/ml y Difenilhidantoína sódica 50 mg/ml, dosis 0,2 ml/kg I.V.

## **Registros**

El responsable del Bioterio recibirá la ficha (\*) suministrada por el Investigador y la completará con los datos del procedimiento.

De esta manera quedará registrado:

1. nombre del investigador responsable,
2. lugar de trabajo,
3. fecha de inicio y finalización del protocolo,
4. características del Antígeno: naturaleza, origen, método de obtención y purificación,
5. fecha de las inyecciones y sangrados,
6. cantidad de Antígeno y volúmenes de emulsión inyectados,
7. adyuvante utilizado,
8. volúmenes de sangre extraídos.

De 1 a 4 son datos provistos por el investigador y de 5 a 8 serán completados por el responsable del Bioterio.

(\*) disponible en el transparente virtual de la SeCyT-FCByF en el apartado correspondiente al CICUAL-FCByF

## **Esquema de protocolo de inmunización**

En líneas generales se seguirá el siguiente esquema de inmunización y sangrados:

- **1**-sangrado preimmune
- **2**-día 1 primera inoculación
- **3**-día 21 a 30 segunda inoculación
- **4**-10 a 12 días posteriores sangrado
- **5**-descanso 3 a 4 semanas
- **6**-nuevo sangrado o booster según respuesta obtenida