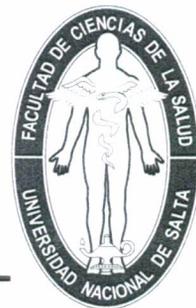




Universidad Nacional de Salta
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

AV. BOLIVIA 5150 – A4408FVY SALTA
REPUBLICA ARGENTINA
TELEF. (0387) 4255404/330/332
TELEF. FAX (0387) 4255456



RESOLUCION -CD- N° **311-18**

Salta, 09 MAY 2018
Expediente N° 12.166/18

VISTO: La nota presentada por la Dra. Cecilia PÉREZ BRANDAN, solicitando aprobación de protocolo de utilización de animales, en el proyecto denominado “**Evaluación de diferentes alternativas de inmunización contra Trypanosoma cruzi**”; y;

CONSIDERANDO:

Que fue presentado, a fojas 2 a 10, el proyecto de protocolo para la utilización de animales de experimentación, para ser evaluado por el Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

Que el Comité, a fojas 12, emite dictamen aprobando el mencionado proyecto.

POR ELLO: en uso de las atribuciones que le son propias y en virtud de lo aconsejado por la Comisión de Docencia, Investigación y Disciplina, de este Cuerpo, en Despacho N° 87/18;

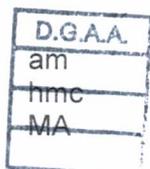
EI CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

(En Sesión Ordinaria N° 05/18, del 24/04/18)

RESUELVE

ARTICULO 1°: Aprobar el protocolo de utilización de animales para experimentación en la ejecución del proyecto de investigación denominado: “**Evaluación de diferentes alternativas de inmunización contra Tripanosoma Cruzi**”; presentado por la Dra. Cecilia PÉREZ BRANDAN, el que como Anexo I forma parte de la presente Resolución.

ARTÍCULO 2° Hágase saber y remítase copia a: Dra. Cecilia PÉREZ BRANDAN, Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, y siga a Dirección Administrativa Académica de esta Facultad a sus efectos.



MGS. EUGENIA MARIA VILLAGRAN
SECRETARIA DE POSGRADO, INVESTIGACION
Y EXTENSION AL MEDIO
FAC. DE CIENCIAS DE LA SALUD - UNSa



Lic. MARIA SILVIA FORSYTH
DECANA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD - UNSa



Universidad Nacional de Salta
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

AV. BOLIVIA 5150 – A4408FVY SALTA
REPUBLICA ARGENTINA
TELEF. (0387) 4255404/330/332
TELEF. FAX (0387) 4255456



RESOLUCION -CD- N° **311-18**

Salta, **09 MAY 2018**
Expediente N° 12.166/18

ANEXO I

PROTOCOLO DE UTILIZACION DE ANIMALES DE LABORATORIO

Instituto de Patología Experimental– CONICET

Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad Nacional de Salta

Fecha de presentación: 10-04-2018

Título del Trabajo: "Evaluación de diferentes alternativas de inmunización contra *Trypanosoma cruzi*"

Investigador Responsable: Dra. Cecilia Pérez Brandán

Lugar de Trabajo: Instituto de Patología Experimental – CONICET-UNSa

Teléfono Laboral: 387-4255333

Email: cecilia.perezbrandan@conicet.gov.ar

Solicita este aval para la presentación de:

Beca

Tesis

Proyecto de Investigación

Docencia

Otros(Especificar)

¿Cuenta con capacitación para el trabajo con animales de experimentación?

	No
<input checked="" type="checkbox"/>	Si

(no invalida la aprobación del protocolo)

(adjuntar certificado)

JUSTIFICAR EL USO DEL MODELO ANIMAL FRENTE A MÉTODOS ALTERNATIVOS IN VITRO

Declaración de métodos alternativos

Técnicas o estrategias experimentales que cumplen con el principio de las tres erres (Reducción del número de animales, Refinamiento de la técnica y Reemplazo de animales por otras técnicas)

Handwritten signature



Universidad Nacional de Salta
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

AV. BOLIVIA 5150 – A4408FVY SALTA
 REPUBLICA ARGENTINA
 TELEF. (0387) 4255404/330/332
 TELEF. FAX (0387) 4255456



RESOLUCION -CD- N°

311-18

Salta, 09 MAY 2018
 Expediente N° 12.166/18

ANEXO I

Indicar el motivo por el cual no se plantea aplicar métodos alternativos al procedimiento propuesto:

El procedimiento propuesto es un método alternativo	
No existe método alternativo al procedimiento	X
Existen métodos alternativos pero no están validados	
Otros motivos: (Especificar en detalle)	

Justificar con bibliografía

El proyecto se basa en la evaluación de diferentes inmunógenos experimentales que puedan ser empleados como potenciales vacunas contra la Enfermedad de Chagas. Al tratarse de ensayos de inmunización y desafío si o si necesitamos emplear animales de experimentación que nos permitan medir el tipo de respuesta inmune generada producto de la inmunización y también que nos permitan medir si hubo o no una protección también producto de la vacunación.

Los métodos alternativos existentes son más que nada para el control de la calidad de la vacuna y no para el control de la eficacia de la misma.

De todas maneras planteamos cumplir con el principio de las tres erres, reduciendo en todos los casos posibles al mínimo el número de animales empleados.

En caso de tratarse de pequeños roedores de laboratorio (rata/ratón/hámster/gerbil), indicar su condición microbiológica (convencionales/ libres de patógenos específicos).

Condición microbiológica de los ratones: Indefinida

Animales de Experimentación

Especie	Cepa	Edad	Sexo	N° de animales usados anualmente
Ratón, <i>musculus</i>	MusC 57 B L / 6 endocriada	3 semanas	Machos o hembras	4 experimentos anuales conformado cada uno por 30 ratones (120 ratones anuales). En cada experimento se evaluará una vacuna en particular.

Lugar donde se obtienen los animales utilizados para la experimentación (los Proyectos): Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de Salta.

Handwritten signature



Universidad Nacional de Salta
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

AV. BOLIVIA 5150 – A4408FVY SALTA
REPUBLICA ARGENTINA
TELEF. (0387) 4255404/330/332
TELEF. FAX (0387) 4255456



RESOLUCION -CD- N°

311-18

09 MAY 2018

Salta,
Expediente N° 12.166/18

ANEXO I

Condiciones del Bioterio

Ciclo luz/oscuridad	Temperatura	Extracción de aire	Cambio de cama	Otros
12hs/12hs	23°C	10 a 14 recambios por hora	1 vez por semana	-----

Justificar el uso de los animales, la elección de la especie y el número usado:

Nuestro proyecto se basa en la evaluación de diferentes inmunógenos experimentales contra la enfermedad de Chagas. Esta evaluación hace que resulte indispensable la utilización de un modelo experimental lo más parecido posible al ser humano.

La elección de la cepa de ratones se basa en que estos ratones desarrollan una mejor respuesta inmune celular en comparación con otras cepas como ser la Balb/c o la cepa Swiss y en nuestro caso es de suma importancia medir este tipo de respuesta específica.

Con respecto al número de animales, se empleará el mínimo indispensable para poder llevar a cabo un experimento completo, prolijo y con resultados que puedan ser interpretados. Como mínimo por cada grupo experimental vamos a emplear 5 ratones. Cada experimento cuenta con 6 grupos experimentales (incluyendo controles) y planteamos realizar 4 experimentos anuales.

¿Cómo determinó el tamaño mínimo de la muestra?

Por la utilización del software accesible en el sitio Power and Sample size.com y en base a la experiencia anterior en este mismo tipo de experimentos.

Tipo y tamaño de las jaulas utilizadas en el proyecto, indicando cantidad de animales alojados y su edad.

Las jaulas son de acero inoxidable y sus medidas de 24,5 x 17,5 x 10,5. Por cada jaula se alojarán 5 animales. Los animales sanos se alojan en jaulas aparte. Edad de los animales: 3 semanas.

Duración del proyecto con animales (fecha de inicio y finalización):

Dos años desde Abril de 2018 (04/2018-03/2020).

[Firma manuscrita]



Universidad Nacional de Salta
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

AV. BOLIVIA 5150 – A4408FVY SALTA
REPUBLICA ARGENTINA
TELEF. (0387) 4255404/330/332
TELEF. FAX (0387) 4255456



RESOLUCION -CD- N° **311-18**

Salta, 09 MAY 2018
Expediente N° 12.166/18

ANEXO I

¿Cuenta con apoyo veterinario o técnico calificado?

Si Vet. Maria Celia Mora

PROYECTO- TITULO:

“Evaluación de diferentes alternativas de inmunización contra *Trypanosoma cruzi*”

Objetivos de los Experimentos:

El objetivo general del presente proyecto implica evaluar diferentes inmunógenos experimentales para la enfermedad de Chagas. Proponemos el estudio en conjunto de vacunas de ADN, formulaciones de vesículas de membrana externa bacteriana y/o proteínas recombinantes del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de esta enfermedad.

Fundamentos y propósito del proyecto, sus beneficios científicos o valor docente previsto:

La enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica en América Latina y es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. En Argentina abarca gran parte del territorio norteño. La enfermedad es una zoonosis que afecta a varios vertebrados salvajes, desde donde se transmite al ser humano a través de insectos triatominos. Se calcula que existen aproximadamente 10 millones de personas afectadas. La infección por *T. cruzi* en su etapa crónica se manifiesta por la presencia de megacolon y megaesófago pero principalmente por la aparición de miocardiopatías. Actualmente no existe una vacuna efectiva y los tratamientos quimioterapéuticos traen aparejado una serie de efectos adversos indeseables. Este es uno de los principales motivos que nos llevan a querer trabajar en el desarrollo de una vacuna promisorio para esta enfermedad. Si bien hasta la fecha han sido evaluadas muchas formulaciones vacunales, ninguna ha demostrado proteger totalmente contra una posterior infección con este parásito. Los resultados recolectados de investigaciones previas de nuestro grupo de trabajo más lo publicado por otros grupos de investigación a nivel mundial nos lleva a plantear diferentes alternativas de inmunización que puedan brindar mejores resultados que los obtenidos hasta ahora.

Procedimientos Experimentales:

- a) **Describa en forma breve los procedimientos experimentales que serán realizados en los animales y con qué frecuencia. Disponibilidad o adecuación de los procedimientos que causen el menor daño o sufrimiento posible.**

Los animales de experimentación (n=5) serán inmunizados con 3 dosis de

Maria Celia Mora



Universidad Nacional de Salta
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

AV. BOLIVIA 5150 – A4408FVY SALTA
REPUBLICA ARGENTINA
TELEF. (0387) 4255404/330/332
TELEF. FAX (0387) 4255456



RESOLUCION -CD- N°

311-18

Salta, 09 MAY 2018
Expediente N° 12.166/18

ANEXO I

formulaciones vacunales espaciadas por aproximadamente 10 días. Las inmunizaciones van a ser administradas en forma oral, subcutánea, intraperitoneal o intradérmica de acuerdo a la formulación en particular. Las formulaciones vacunales van a estar compuestas por proteínas recombinantes, ADN, parásitos vivos atenuados, vesículas de membrana bacteriana y/o bacterias atenuadas. De acuerdo a la vía de inoculación los animales serán anestesiados. Antes de cada dosis de inmunización se tomarán muestras de sangre de los animales a partir de la vena caudal. Al final la etapa de inmunización se sacrificará algunos ratones (n=2) para la toma de muestras de órganos específicos. Esto es indispensable para medir el tipo de respuesta inmune inducida por la vacunación en células de bazo por ejemplo. Las muestras de órgano en esta etapa también es fundamental para evaluar el posible daño histopatológico producto de la inmunización. Luego de finalizado el período de las inmunizaciones, los animales (n=3) serán desafiados con parásitos virulentos y a partir de este punto se tomarán muestras de sangre semanalmente para cuantificar la carga parasitaria de la misma. Si, durante esta etapa se observa algún distres en los animales, se les administrará algún analgésico. Al finalizar esta etapa los animales serán sacrificados para la toma de muestra de sangre y órganos específicos para cuantificar carga parasitaria y marcadores inmunológicos.

- b) **En lo posible indique si existen publicaciones con referato internacional donde el/los modelos o el/los procedimientos experimentales hayan sido aprobados por comités de ética institucionales.**

El protocolo de trabajo propuesto es de uso habitual en el área. Numerosas publicaciones detallan protocolos iguales al propuesto, aprobados por comités de ética institucionales. Por ejemplo:

Ana Paula M. M. Almeida, Leopoldo F. M. Machado, Daniel Doro, Frederico C. Nascimento, Leonardo Damasceno, Ricardo Tostes Gazzinelli, Ana Paula Fernandes and Caroline Junqueira. New Vaccine Formulations Containing a Modified Version of the Amastigote 2 Antigen and the Non-Virulent *Trypanosoma cruzi* CL-14 Strain Are Highly Antigenic and Protective against *Leishmania infantum* Challenge. Front Immunol. 2018; 9: 465. doi: 10.3389/fimmu.2018.00465

Mencione el lugar físico donde se llevarán a cabo las maniobras experimentales previstas.

Los experimentos previstos con los animales de experimentación serán llevados a cabo en el Laboratorio de Parasitología del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta.

AF
[Firma manuscrita]



Universidad Nacional de Salta
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

AV. BOLIVIA 5150 – A4408FVY SALTA
REPUBLICA ARGENTINA
TELEF. (0387) 4255404/330/332
TELEF. FAX (0387) 4255456



RESOLUCION -CD- N°

311-18

Salta, 09 MAY 2018
Expediente N° 12.166/18

ANEXO I

c) Enumere las maniobras y cuidados posteriores de los procedimientos experimentales.

Observación regular para signos de distres.

d) Mencione los métodos de apareo y crianza, incluyendo: selección de y edad de los reproductores, edad de destete, etc.

No corresponde.

PROCEDIMIENTOS A REALIZAR CON LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION:

METODO	SI	NO
Restricción de agua y/o alimento		X
Catéter, intubación		X
Modificación de conducta		X
Inoculación de microorganismos	X	
Procedimientos de cirugía c/recuperación		X
Estudios DL50		X
Restricción prolongada + 8 horas		X
Producción de anticuerpos monoclonales		X
Producción de anticuerpos policlonales		X
Procedimientos de cirugía s/recuperación	X	
Extracción de sangre ¹	X	
Toma de muestras de tejidos ²	X	

1. En caso de respuesta afirmativa a "Extracción de Sangre" completar:

a. Fase del procedimiento:	Durante el periodo de inmunización y desafío
b. Zona de extracción del animal:	De la vena caudal
c. Cantidad a extraer:	10-100µl

2. En caso de respuesta afirmativa a "Toma de muestras de Tejidos" completar:

a. Fase del procedimiento:	Luego del sacrificio
b. Órgano/tejido a extraer:	Bazo, corazón, músculo esquelético, colon.
c. Cantidad a extraer:	Todo el órgano



Universidad Nacional de Salta
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

AV. BOLIVIA 5150 – A4408FVY SALTA
REPUBLICA ARGENTINA
TELEF. (0387) 4255404/330/332
TELEF. FAX (0387) 4255456



RESOLUCIÓN –CD- N° **311-18**

09 MAY 2018
Salta,
Expediente N° 12.166/18

ANEXO I

Administración de drogas, tóxicos, u otras sustancias durante el procedimiento experimental

	SI	NO	Droga	Dosis	Vía	Frecuencia de Administración
Anestésicos	X		Ketamina/xilacina	0.025ml/10gr	IP	Cuando se lo requiera
Analgésicos		X				
Sedantes		X				
Otros (cada ítem corresponde a un experimento en particular)			1. Suspensiones de ADN plasmidial	50µg/ratón	Intra-muscular	3 dosis en total administradas una vez por semana
			2. Parásitos atenuados	100µl/ratón	Intra-peritoneal	3 dosis en total administradas una vez por semana
			3. Proteínas recombinantes	25µg/ratón	Intra-dérmica	3 dosis en total administradas una vez por semana
			4. Suspensiones de vesículas bacterianas atenuadas	100µl/ratón	Oral, IP u subcutáneo	3 dosis en total administradas una vez por semana

Los animales serán eutanasiados?	Si	X	No	
Método de eutanasia utilizado	CO ₂			

Elección del momento de aplicación de eutanasia como punto final del experimento.
Se utilizarán los criterios estándar indicados por protocolos internacionales y por el CICUAL para el caso del punto final clínico: los animales serán sacrificados en caso de

Mano escrita



Universidad Nacional de Salta
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

AV. BOLIVIA 5150 – A4408FVY SALTA
REPUBLICA ARGENTINA
TELEF. (0387) 4255404/330/332
TELEF. FAX (0387) 4255456



RESOLUCION -CD- N° **311-18**

Salta, 09 MAY 2018
Expediente N° 12.166/18

ANEXO I

automutilación, fiebre, anorexia, inmovilidad o presencia de otros signos de dolor o diestrés que no puedan ser manejados por analgesia. En el caso de que los animales no manifiesten diestrés durante la sobrevida, el punto final experimental ocurrirá ocho semanas luego de inoculado el parásito.

Disposición de los restos:

Incineración	
Freezer	
Residuos Patológicos	X
Otros	

Riesgos para el personal o para la población animal del Bioterio:
El riesgo es mínimo.

INSTRUCCIONES PARA EL PERSONAL TÉCNICO DE LA FCS A CARGO DEL CUIDADO DE LOS ANIMALES:

Animales Enfermos		Animales Muertos		Problemas Técnicos	
Llamar al investigador	X	Llamar al investigador	X	Llamar al investigador	X
Sacrificar los animales		Enviar al laboratorio		Llamar al taller	
Enviar al laboratorio		Enviar a incineración			

USO DE AGENTES PELIGROSOS:

Agente	Si	No
Infeciosos	X	
Radioisótopos		X
Carcinógenos		X
Tóxicos químicos		X
Tóxicos biológicos		X
Otros (especificar)		

En caso afirmativo, indicar:

Agente	Vía de administración	Volumen final	Concentración
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Oral o intraperitoneal	100ul	100 parásitos por ratón
<i>Salmonella enterica</i> atenuada	Oral	100ul	10 ⁹ UFC por ratón

[Firma manuscrita]



Universidad Nacional de Salta
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

AV. BOLIVIA 5150 - A4408FVY SALTA
REPUBLICA ARGENTINA
TELEF. (0387) 4255404/330/332
TELEF. FAX (0387) 4255456



RESOLUCION -CD- N°

311-18

Salta, 09 MAY 2018
Expediente N° 12.166/18

ANEXO I

17- SUPERVISIÓN DE LOS ANIMALES

Describir aquellas fases del procedimiento en el que se prevea que el animal puede experimentar alteraciones del bienestar, dolor o angustia. Detallar el protocolo de supervisión que se utilizará para detectar estas alteraciones, dolor o angustia.

Se considerará punto final el momento en el que el animal presente modificaciones de importancia de sus signos vitales y/o comportamiento que comprometan su bienestar.

Los animales serán observados diariamente en busca de signos de distrés luego del esquema de inmunización y de infección. Se considerarán signos de distrés: automutilación, fiebre, anorexia, inmovilidad o presencia de otros signos de dolor que no puedan ser manejados por analgesia. En tal caso se procederá al punto final humanitario de los animales.

El cumplimiento del presente Protocolo será de total responsabilidad del Investigador Responsable, así como del Grupo involucrado.

Nombre y Apellido del Investigador Responsable, así como del Grupo involucrado:

Dra. Cecilia Pérez Brandán



MGS. EUGENIA MARIA VILLAGRA
SECRETARIA DE POSGRADO, INVESTIGACIÓN
Y EXTENSIÓN AL MEDIO
FAC. DE CIENCIAS DE LA SALUD - UNSa



Lic. MARIA SILVIA FORSYTH
DECANA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD - UNSa