



Dist. 176/17



**COMISIÓN HONORARIA DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL
(C.H.E.A.)**

**FORMULARIO PARA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN Y
DOCENCIA CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

I.- INFORMACIÓN PRELIMINAR

1.- Institución:

Nombre

Departamento

Laboratorio

Director del Departamento, Cátedra o Laboratorio:

Nombre	Teléfono	Correo Electrónico
Juan Cedano	47337133	jcedano@unorte.edu.uy

2.- Título del Protocolo:

Inmunoestimulación y el levantamiento del escape tumoral en el tratamiento del cáncer en modelo murino de xeno-tumor diseminado y local.

3.- Responsable del Protocolo experimental:

Nombre	Teléfono	Correo Electrónico	Nivel de Acreditación
Gabriela Ferragut	47337133	gferragu@fq.edu.uy	C2

4.- Uso propuesto de los animales:

Docencia

Investigación

Otros

Explique (nombre del curso, título del proyecto en el cual se desarrollará, etc.):

No ha lugar

5.- Fuente de financiamiento solicitada y duración:

Se solicitará en un proyecto CSIC en la convocatoria de 2016 para financiarlo.

6.- Laboratorio / Bioterio/ Centro experimental donde se llevará a cabo el protocolo:

Se llevará a cabo en el laboratorio de Inmunología del CENUR del Litoral Norte, de la ciudad de Salto.

II.- INFORMACIÓN ESPECÍFICA DEL PROTOCOLO

1.-Indique brevemente de qué manera este proyecto es relevante para la salud humana o animal para el avance del conocimiento o del bienestar de la sociedad.

Nuestro proyecto es una estrategia biotecnológica, usando inmunoterapia, para aprovechar la capacidad del sistema inmune para eliminar tumores. Se va a explorar la inmunoestimulación directa para aumentar la población de células con capacidad de degradar tumores usando el factor de crecimiento de granulocitos G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor). Pues, se suele asumir una mayor incidencia de cáncer con cierta inmunodeficiencia. Pero dado que los tumores también pueden crecer en pacientes con un sistema inmunitario intacto, también queremos ensayar dos estrategias para levantar dos de las principales vías que usan los tumores para escapar del sistema inmunitario del individuo: La vía IDO (Indoleamine 2,3-DiOxigenasa) y la vía de la α -N-acetilgalactosaminidasa (Nagalasa) que degrada parte de la glicosilación del precursor del factor de activación de macrófagos (MAF) impidiendo su activación. La vía de la IDO la intentaremos inhibir a nivel local, mediante el uso de la quinureninasa (Kyn); pues esta vía también interviene en otros procesos celulares no patológicos. La vía de la Nagalasa, la intentaremos bloquear mediante la producción de anticuerpos contra regiones próximas a su centro activo, pues sólo la fracción extracelular de esta proteína es la que está implicada en el escape tumoral y los anticuerpos sólo afectarán a esta fracción. Dado que estas estrategias a) pueden tener efectos sinérgicos entre ellas, b) pueden tener efecto preventivo inhibiendo el proceso de establecimiento del tumor, c) terapéutico contra el tumor ya establecido, e) efectos sobre tumores locales d) o sobre tumores diseminados, con mayor o menor eficacia; proponemos un proyecto en el que estudiaremos todos estos factores mediante un diseño de análisis de la varianza anidado que nos permita minimizar el número de animales, cruzando estos factores:

-Factor celular:

*Mediante la eliminación de la tolerancia tumoral; la quinureninasa, un enzima que degrada el metabolito L-quinurenina, producido por la proteína IDO, e implicada en mecanismos de tolerancia inmunitaria.

*Además de usar la quinureninasa se realizará una estimulación con el factor G-CSF, que permite aumentar la población de neutrófilos circulantes; una población de células fagocitarias que se ha visto implicada en la degradación de tumores.

-Factor humoral (vacuna contra la enzima Nagalasa):

*Estudiaremos efectos inhibitorios sobre la implantación de la presencia de anticuerpos contra la Nagalasa,

*y efectos inhibitorios del crecimiento del tumor a la inmunización de la Nagalasa una vez los tumores ya están implantados.

A posteriori, se realizará un estudio de la combinación de tratamientos que mejor resultados proporcione para obtener una imagen más precisa del efecto y si influye en la reducción de la muerte especialmente por caquexia.

La ventaja de esta aproximación es que proporciona mayor capacidad de respuesta inmune a la vez que elimina los mecanismos de resistencia y es aplicable a un amplio rango de tumores.

Por todo ello, se trata de un experimento de alta relevancia para la salud humana.

2.-Complete el siguiente cuadro acerca del modelo experimental a usar:

2.a. Modelo *in vivo*:

Especie	Ratones (<i>Mus musculus</i>)
Raza/ Cepa	Balb/C
Sexo	Machos
Edad	9 semanas
Peso	35 gramos

2.b. Modelo *in vitro*:

Cultivo Celular Primario (especifique)	
Organo Aislado (especifique)	
Otros	

3.a. Justifique el uso de la(s) especie(s) seleccionada(s) y número a utilizar.

Se van a utilizar 64 animales (54 para dos estudios exploratorios y 10 para estudio de sobrevida) en tres experimentos, se usa esta especie por ser la mejor caracterizada para este tipo de abordaje experimental. El número es el menor número posible que nos pueden garantizar una cierta probabilidad que el grado de significación del estudio sea alto.

3.b. En caso de que los animales hayan sido utilizados en otro(s) protocolo(s), mencione en cuales (título) y cuando se aprobaron.

NO

3.c. Indique el método estadístico a emplear, si se basa en un modelo ya utilizado, cítelo. En caso de consultar a un estadístico, comuníquelo.

Inicialmente se realizará un análisis de la varianza con dos factores anidados [1], esto nos permitirá estudiar todos los factores a la vez que reducimos el número de animales. Como variable de control se usará un diseño en cuadrado latino, a fin de tener un estimador de la variabilidad subyacente, no asociadas a los factores estudiados. Para ello haremos tres ensayos, en los dos primeros estudiaremos el efecto de los factores celulares sobre la formación de tumores ya sea local o diseminado con respecto a los efectos humorales (producción de anticuerpos contra la Nagalasa para levantar el escape tumoral). Los factores celulares que estudiaremos serán uno específico como es el levantamiento de la tolerancia inducida por IDO mediante el uso de la quinureninasa y otro inespecífico estimulando a la vez la formación de neutrófilos. Y el factor humoral estudiado será el efecto de una vacuna contra la Nagalasa sobre la implantación metastásica en la que la administración de la primera dosis de la vacuna será anterior a la inoculación del tumor y el efecto postvacunal, en el que la vacunación se realizará una vez que el tumor ya ha anidado. Para, esto nos permitirá con sólo 54 animales tener un número aceptable de replicas. Se usará un ratón macho y uno hembra, aunque no creemos que el sexo tenga ningún efecto sobre el tratamiento. Pero por si acaso también se analizará este factor.

El esquema general del ensayo sería:

<u>Tumor Localizado</u>		<u>Celular</u>		
	n° animales	Kyn	Kyn+G-CSF	NoEstimu
Humoral	PreVac	3	3	3
	PostVac	3	3	3
	NoVac	3	3	3

<u>Tumor Diseminado</u>		<u>Celular</u>		
	n° animales	Kyn	Kyn+G-CSF	NoEstimu
Humoral	PreVac	3	3	3
	PostVac	3	3	3
	NoVac	3	3	3

Es decir, 27 animales para el estudio del tumor localizado y otros 27 para el ensayo en tumor diseminado.

Una vez determinado la mejor combinación de tratamiento. Se calcularía una curva de sobrevida Kaplan-Meier. Para ello tomaríamos 5 ratones control y 5 ratones tratados, aunque este número de ratones podrá variar según el grado de significación observado en los ensayos anteriores, para garantizar una buena significación con el número mínimo de ratones. En este último ensayo con ratones, estos no serían sacrificados en un momento predeterminado, se dejará que evolucionen hasta la muerte del último ratón. La masa tumoral se caracterizará midiendo el tamaño del tumor en el costado del ratón durante su crecimiento y se determinará el peso del animal a lo largo del tiempo y a la muerte del animal. El peso real del tumor, no sólo la estimación por su tamaño, se pesará a su muerte, también se determinará el grado de caquexia restando el peso del tumor del peso total del ratón al morir. El dato de la tasa de muerte por caquexia es muy importante pues es una de las razones de muerte más frecuentes en pacientes con cáncer terminal, uno de los objetivos a los que se dirige nuestra estrategia inmuno estimuladora de la respuesta contra el cáncer. Todos estos parámetros serán analizados estadísticamente haciendo las curvas de progresión en el tiempo acompañada de los datos de dispersión.

Con estos 5+5 animales usados para calcular la curva de sobrevida, que junto con los 54 de los estudios exploratorios, hacen un total se 65 animales.

1. Sokal, Robert.; Rohlf, F James, - *Introducción a la bioestadística*. Reverté. 2002.
2. Kaplan, E. L.; Meier, P.: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Amer. Statist. Assn.* 53:457-481, 1958.

3.d. Indique los motivos por los que no se plantea el uso de métodos alternativos al propuesto.

Los métodos alternativos son o más costosos o menos relevantes.

4. Indique fuentes de información consultadas (para procedimientos del protocolo).

1. Burghoff S, Gong X, Viethen C, Jacoby C, Flogel U, Bongardt S, Schorr A, Hippe A, Honey B, Schrader J: **Growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells is not critically dependent on host CD73 expression in mice.** *BMC Cancer* 2014, **14**:898.
2. Manual de cuidados e procedimentos com animais de Laboratorio do Biotério de produção e Experimentação da FCF-IQ/F SP São Pablo FCF-IQ/FSP 2013
3. Petrovsky N, Aguilar JC: **Vaccine adjuvants: current state and future trends.** *Immunol Cell Biol* 2004, **82**(5):488-496.
4. Billiau A, Matthys P: **Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases.** *J Leukoc Biol* 2001, **70**(6):849-860.
5. Bru A, Albertos S, Lopez Garcia-Asenjo JA, Bru I: **Pinning of tumoral growth by enhancement of the immune response.** *Phys Rev Lett* 2004, **92**(23):238101.
6. Primera Ley Nacional 18.611 Promulgada 02/10/2009 "Procedimientos para la utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación Científica"

5.a- Marque el tipo de procedimiento experimental que se llevará a cabo con los animales.

Etológico (Comportamental)	
Quirúrgico	
Farmacológico	En oncología
Mutagénico	
Infeccioso	
Nutricional	
Otro (Explique)	

5.b- Describa en detalle todos los procedimientos con animales y su duración que se realizarán con los animales, indicando si son invasivos o no, crónicos o agudos.

Los animales serán adquiridos a la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación de Facultad de Medicina de la Universidad de la República. Durante el protocolo los animales serán mantenidos en una Cabina Mantenimiento Animales (FLUFRANCE) en condiciones de temperatura, humedad y presión controladas, con aire filtrado, con período de luz y oscuridad (12h/12h). Se les administrará alimentación (ración peleteada) y agua a discreción.

Se dispondrán en 9 cajas con 3 animales por caja para condición estudiada para el caso del grupo con tumores diseminados. Idem para el estudio de tumores localizados. Una vez determinada la mejor combinación de tratamiento, se alojarán en 2 cajas, 5 animales por caja, una caja con controles y otra con tratados.

Anestesia: Los ensayos que requieran de especial manipulación de los animales como la inyección del alérgeno con adyuvante, o de en la musculatura de la pata, la inyección de las células tumorales o sacrificio del animal; vendrán precedida por la administración de pentobarbital sódico (intraperitoneal) en una dosis de entre 30 a 50 mg/kg. Esta dosis es suficiente para anestesiar los ratones durante el lapso de tiempo necesarios para este tipo de manejo (suele durar entre 20 a 30 min.). Los calibres de las agujas usadas para la inyección intraperitoneal o intramuscular será (26G 3/8" 0,4 x 12 mm) y para la vía intra venosa se usarán agujas (27G 0,40 x 12 mm).

El diseño experimental que hemos elegido permite testar los efectos sinérgicos de la producción de anticuerpos contra la nagalasa y el efecto de levantar la inmunotolerancia tumoral con o sin estimulación de los neutrófilos. Dado que lo que queremos ver son los efectos sinérgicos, se ha de co-administrar sobre algunos de los ratones los dos tipos de tratamientos. Por eso se detallan a continuación el protocolo de vacunación y el de inmuno-estimulación, detallados en semanas, ambos se repetirán para ver los efectos sobre la implantación local del tumor como para los tumores diseminados.

En ensayo, se medirá por palpación los tumores y peso de los animales. Tras el sacrificio, se medirá la tasa de implantación tumoral evaluado por el número de tumores presentes en pulmones, hígado, riñones, cerebro y cavidad abdominal.

En el ensayo de sobrevida, con 5 animales tratados y 5 control, se seguirán el mejor de los tratamientos antes testados, pero sin sacrificar los animales en la semana 10 y se analizará los mismos parámetros.

(#) El protocolo de inoculación de los tumores se realizarán en la segunda semana, en el flanco se inocula 1×10^6 células A20 (para el modelo de tumor localizado) y la misma cantidad de células de melanoma B16F10 (para el modelo de tumor diseminado) en la vena de la cola [1].

(+) Para la inmuno estimulación se usarán 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de quinurenina y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de G-CSF durante 15 días consecutivos siguiendo este calendario [2] en el grupo control se les inyectará la misma cantidad de tampón sin principio activo.

(*) La vacunación consistirá en dos dosis vacunales para la inmunización con la Nagalasa se usarán 2 dosis de 100 μg de proteína con 100 μg PLS [3,4] y adyuvante de Freund [5], usando este calendario para los diferentes animales:

Semana	3			3			3			núm. Ratones
	PreVac			PostVac			NoVac			
	Kyn	Kyn+ G-CSF	Agua	Kyn	Kyn+ G-CSF	Agua	Kyn	Kyn+ G-CSF	Agua	
0	*	*	*							Vacunación *
1							^	^	^	Suero fisiol. ^
2	#*	#*	#*	#	#	#	#	#	#	Inoc. Células #
3				*	*	*				
4							^	^	^	
5				*	*	*				
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Tratam. Diario +
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
8										
9										
10	&	&	&	&	&	&	&	&	&	Sacrificio &

Tras la muerte o el sacrificio, los órganos de interés serán preservados para futuros estudios. Pero para garantizar que las muestras conserven lo más fielmente posible las características originales del tejido se procederá a inmovilizar las proteínas del tejido mediante su inclusión en un matriz que polimerice en el interior del tejido [6], mediante un gelificación en archilamida, bis-acrilamida, que también reacciona con las proteínas gracias a utilizar un catalizador de la reacción de polimerización termo sensible que permite contar con el suficiente tiempo para hacer que la solución gelificante penetre en el tejido, para después mediante un cambio de temperatura inducir la reacción de gelificación que se extenderá por todo el tejido. Eso permitirá realizar estudios inmuno-histológicos más profundos en el futuro que no se limiten al tamaño de los tumores, pues el tejido se puede clarificar, extrayendo mediante electroforesis los lípidos que dan color a los tejidos, haciéndolo transparente y a la vez accesible a los anticuerpos para realizar los marcajes o tinciones oportunas y establecer relaciones precisas con las células, receptores, proteínas y interleuquinas que están interviniendo en el proceso estudiado.

Bibliografía:

1. Burghoff S, Gong X, Viethen C, Jacoby C, Fogel U, et al. (2014) Growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells is not critically dependent on host CD73 expression in mice. BMC Cancer 14: 898.
2. Bru A, Albertos S, Lopez Garcia-Asenjo JA, Bru I (2004) Pinning of tumoral growth by enhancement of the immune response. Phys Rev Lett 92: 238101.
3. Muthukkumar S, Muthukkaruppan VR (1993) Mechanism of protective immunity induced by porin-lipopolysaccharide against murine salmonellosis. Infect Immun 61: 3017-3025.
4. Petrovsky N, Aguilar JC (2004) Vaccine adjuvants: current state and future trends. Immunol Cell Biol 82: 488-496.
5. Billiau A, Matthys P (2001) Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. J Leukoc Biol 70: 849-860.
6. Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, et al. (2013) Structural and molecular interrogation of intact biological systems. Nature 497: 332-337.

6.- Especifique en cuál de estas situaciones se ubica el procedimiento utilizado:

Manejo indoloro del animal	
Manejo del animal con un estrés moderado	54 animales
Manejo del animal con alto nivel de estrés	
Tratamiento crónico o agudo en condiciones de estrés	10 animales

7.a.- Indique en qué etapas o manipulaciones se prevé que el animal pueda experimentar dolor, sufrimiento o ansiedad. ¿Cómo y quién lo supervisará y qué medidas están previstas para evitarlo?

Durante la inoculación del tumor (vena caudal y costado en la región interfemorale) y la inoculación de los inmunomoduladores en la vena caudal. Para todas estas manipulaciones el animal será sedado con pentobarbital sódico (intraperitoneal) de 30 a 50 mg/kg. Se monitorizará dos veces después de la inoculación durante dos horas.

7.b.- Indique si se utilizará analgésico, anestésico o tranquilizante para minimizar el dolor.

	Analgésico	Anestésico	Tranquilizante
Principio Activo		pentobarbital	
Dosis		30-50 mg/kg	
Vía de administración		intraperitoneal	

Frecuencia de administración		Antes de manipulación que pueda implicar sufrimiento	
Duración del tratamiento		54 ratones recibirán 16 veces inyecciones 10 semanas y 10 ratones recibirán 15 inyecciones y se esperará a que mueran por si mismos.	
Responsable de la administración		Gabriela Ferragut	

7.c.- Especifique la razón en el caso que no se planifiquen tales tratamientos

Sí, se ha planificado

8.- Finalización del Protocolo de Experimentación y/o Docencia

8.a.- Está previsto mantener a los animales con vida. Explique razones.

No, serán sacrificados o se esperará a que mueran para analizar sus órganos.

8.b.- Está previsto sacrificarlos, explique razones. En este caso indique qué método de eutanasia utilizará y quién realizará el procedimiento.

Se sacrificarán por sobredosis de anestésico, ya que necesitamos los órganos para analizarlos. Si los ratones no son capaces de beber por sí sólo, se les sacrificará pues en este caso el ratón entrará en un estado crítico e irreversible de la evolución de la patología.

8.c.-Indique cómo eliminará los residuos biológicos producidos durante este protocolo.

Se eliminará, de acuerdo al tipo de material. Los corto-punzantes en contenedores apropiados. Los guantes en bolsas apropiadas. Los ratones, una vez sacrificados o cuando hayan muerto se incinerarán.

III.- PERSONAL Y EQUIPAMIENTO

1.- Personal que participará en el protocolo

Nombre	Nivel de acreditación	Cargo a ocupar	Actividad que llevará a cabo
Grabriela Ferragut	C2	Investigador	Todos los procedimientos con los animales.
Omar Sena	A2	Cuidador	Se encargará de mantenimiento, limpieza y alimentación de los animales.

2.- Personal que atenderá los animales

Personal a cargo del mantenimiento, cuidado, reproducción y bienestar de los animales (se exige por lo menos un responsable acreditado por la C.H.E.A).

Nombre y apellido: Omar Sena

Posición laboral: Funcionario Escalafón E3, grado 11 con dedicación exclusiva para funcionario no docente.

3.- Indique los elementos de protección personal que se utilizarán durante todo el protocolo (ej. guantes, mascarillas, gafas, viseras, protectores auditivos, tapabocas, mamelucos, túnicas, zapatos, cubrezapatos, gorros, etc).

Se utilizarán guantes, gafas y túnicas.

4.- Indique si en el marco del procedimiento experimental, se utilizarán algunos de los siguientes dispositivos:

Campana de Gases	NO
Cabina de Seguridad Biológica (especifique Nivel)	NO
Cabina de Flujo Laminar (especifique Nivel)	Cultivo de células usadas para inducir tumores

5-Instalaciones y equipamiento

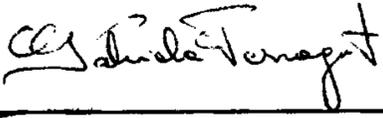
5.a- Indique la fuente o el proveedor de los animales (nombre y local de cría) y en qué local se mantendrán los mismos durante el protocolo (Institución, Servicio, Laboratorio, etc.). Así mismo el equipamiento con que cuenta el local para mantener los animales.

Los animales serán adquiridos a la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación de Facultad de Medicina de la Universidad de la República. Durante el protocolo los animales serán mantenidos en una Cabina Mantenimiento Animales (FLUFRANCE) en condiciones de temperatura, humedad y presión controladas, con aire filtrado, con período de luz y oscuridad.

5.b- Desglose de gastos y origen de fondos.

Insumo	Total a gastar	Origen de los fondos
Compra Animales, inquilinato, etc	12000	Proyecto CSIC 2016
Líneas Celulares	36000	Proyecto CSIC 2016
Material de laboratorio (guantes, tapabocas, jeringas, etc.)	6000	Proyecto CSIC 2016
Reactivos (anestésicos, analgésicos, etc.)	2000	Proyecto CSIC 2016
Total	56000	

IV -DECLARO QUE LA INFORMACIÓN APORTADA ES VERAZ Y CIERTA,

Nombre del Responsable del Protocolo	Gabriela Ferragut
Firma	
Fecha	06/12/2016

ESTE PROTOCOLO TIENE VALIDEZ POR CINCO AÑOS LUEGO DE LA APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA.

Modificaciones realizadas luego de su aprobación, como ser un cambio en los operarios, el número de animales a usar, anestésicos, etc. Se deberán comunicar y pedir aprobación al Comité mediante una carta explicativa.

Cualquier cambio en el procedimiento amerita presentar un nuevo protocolo al Comité de ética del servicio.

¿Autoriza a que el protocolo sea publicado en la página web de la CHEA?

SI

NO

V.- REVISIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INSTITUCIÓN

La presente solicitud:

Fue aprobada en su versión original	
Fue aprobada en una versión modificada	
Es necesaria mayor información / estudio.	
No fue aprobada	

Comentarios del Comité de Ética

Miembros del Comité de Ética

Firma

Fecha

En el día de la fecha, 15 de marzo de 2017,
ante la convocatoria realizada desde Secretaría,
se reúne la CEUA del CENUR Litoral Norte
para volver a considerar el protocolo remitido

por Dr. Juan Cedeno, el 06/12/2016.

Se analiza si se efectuaron las correcciones
solicitadas por la Comisión en reunión del 30/11/2016.

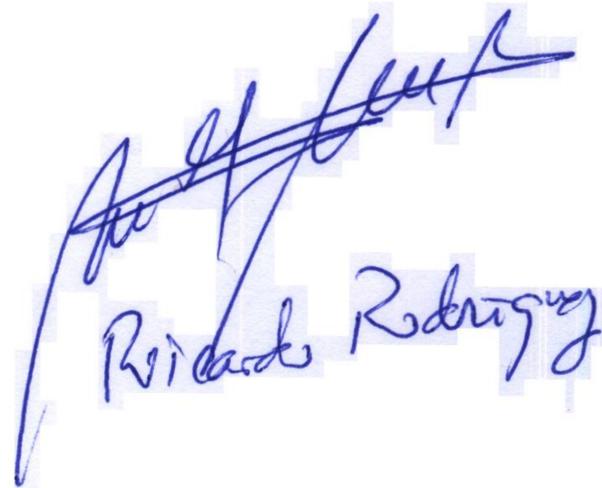
Al ser atendidas las mismas, la CEUA queda
en conformidad con los procedimientos con los
animales.

Esta Comisión aprueba el protocolo.

Por lo tanto se eleva por la consideración del
Consejo del CENUR. En caso de aprobación
Solicitamos su posterior indexación con el N° 01/2017.
y su publicación en la web institucional


JAVIER GRILLO


Zully Hernández


Ricardo Rodríguez