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- Nº 745-17

13 NOV 2017

Salta,
Expediente Nº 12.474/17

VISTO: La nota presentada por la Dra. Dolores CARRER y la Dra. Paola BARROSO, solicitando aprobación de protocolo de utilización de animales, en el proyecto denominado "**Formulación Liposomales para el tratamiento tópico de Leishmaniasis cutánea**"; y;

CONSIDERANDO:

Que fue presentado pertinentemente, a fojas 1 a 8, 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 9, emite dictamen aprobando el mencionado proyecto.

Que la Secretaría de Postgrado, Investigación y Extensión al Medio, a fojas 10, solicita el tratamiento en el Consejo Directivo del proyecto final.

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 Nº 297/17;

El CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

(En Sesión Ordinaria Nº 14/17, del 26/09/17)

R E S U E L V E

ARTICULO 1º: Aprobar el protocolo de utilización de animales para experimentación en la ejecución del proyecto de investigación denominado: "**Formulación Liposomales para el tratamiento tópico de Leishmaniasis cutánea**"; presentado por la Dra. Dolores CARRER y la Dra. Paola BARROSO, el que como Anexo I forma parte de la presente Resolución.

ARTÍCULO 2º Hágase saber y remítase copia a: Dra. Dolores CARRER, Dra. Paola BARROSO, Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, y siga a Dirección Administrativa Académica de esta Facultad a sus efectos.

D.G.A.A.
am
hme
MA

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

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SALTA - FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

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- Nº 745-17

13 NOV 2017

Salta,
Expediente Nº 12.474/17

ANEXO I
PROTOCOLO DE UTILIZACION DE ANIMALES DE LABORTORIO - IPE– CONICET- FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD - UNSA

Cuestionario para el uso de animales de laboratorio

- **Fecha de presentación:** 26/7/17
- **Lugar de Trabajo:** Instituto de Investigación Médica M y M Ferreyra-CONICET. Universidad Nacional de Córdoba.
- **Teléfono Laboral:** 0351-4681465 Int 140
- **E-mail:** dolorescarrer@immf.uncor.edu
- **Solicita este aval para la presentación de:**

  Beca
  Tesis
  X **Proyecto de Investigación**
  Docencia
  Otros(Especificar)

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

	No
X	**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 (**R**educción del número de animales, **R**efinamiento de la técnica y **R**eemplazo de animales por otras técnicas)

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

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- Nº 745-17

Salta, 13 NOV 2017
Expediente Nº 12.474/17

ANEXO I

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

Justificar con bibliografía

"***Formulaciones liposomales para el tratamiento tópico de Leishmaniasis cutánea***". El proyecto implica el estudio de la eficacia de diversas drogas incorporadas en vehículos adecuados para 1- matar parásitos de Leishmnia en cultivo 2- disminuir la carga de parásitos intracelulares en una línea celular de macrófagos murinos en cultivo infectados con Leishmania 3- lograr una buena penetración del activo terapéutico en piel de lesiones in vitro (Protocolo A) 4-tratar in vivo las lesiones de ratones Balb/c infectados de forma intradermal con Leishmania Amazoniensis (protocolo B).

Utilizaremos un esquema de trabajo donde nos vamos acercando paulatinamente al modelo más cercano posible a la enfermedad en humanos. Comenzaremos por estudios in vitro (reemplazo) para poder descartar las drogas/formulaciones que no arrojen buenos resultados, y así poder utilizar la menor cantidad posible de animales (reducción).
Sin embargo, dado que el objetivo último es encontrar una formulación que sea efectiva para el tratamiento de la LC en humanos, el uso de un modelo animal de la enfermedad es indispensable. Lamentablemente, los resultados obtenidos con parásitos/células infectadas *in vitro* con frecuencia no reproducen cualitativa ni cuantitativamente los resultados obtenidos in vivo (Thomas y otros 2014). En parte esto se debe a que la eficacia de las formulaciones es fuertemente dependiente de su capacidad para hacer llegar una cantidad adecuada de droga a la dermis. Por ello realizaremos inicialmente experimentos para medir en lesiones de LC tempranas, la penetración de las moléculas terapéuticas en piel de ratones, cuando la epidermis del animal todavía no se ha lesionado. Utilizaremos entonces la información obtenida de tres experimentos "*ex vivo*" distintos para poder disminuir lo más posible la cantidad de animales utilizados en la última etapa del proyecto.
Refinamiento: utilizaremos los protocolos ya probados por la comunidad internacional para el diseño de nuestros experimentos.

Condición microbiológica de los ratones: convencionales.

Referencias:

N. Thomas, K. Richter, T. B. Pedersen, R. Holm, A. Müllertz, T. Rades (2014) *In Vitro* Lipolysis Data Does Not Adequately Predict the *In Vivo* Performance of Lipid-Based Drug Delivery Systems Containing Fenofibrate. AAPS J. 16, 3: 539–549.

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- Nº 745-17

Salta, 13 NOV 2017
Expediente Nº 12.474/17

ANEXO I

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

- **Animales de Experimentación**

Especie	Cepa	Edad	Sexo	Nº de animales usados anualmente
Ratón, *Mus musculus*	BALB/c	5 semanas (adultos)/20 gr	hembras	3 experimentos al año (1 protocolo A, dos protocolos B). Protocolo A= 14 animales/año. Protocolo B= 35 animales por experimento; 70 animales al año.

- Lugar donde se obtienen los animales utilizados para la experimentación (los Proyectos).

Instituto de Patologia Experimental.

- **Condiciones del Bioterio**

Ciclo luz/oscuridad	Temperatura	Extracción de aire	Cambio de cama	Otros
12hs/12hs	23 C	La habitual para los animales sanos 14 cambios de aire/h	Frecuencia habitual para animales sanos 1 vez por semana	Los animales infectados serán separados de los animales controles (sanos)

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

Debemos usar animales debido a que estamos intentando desarrollar una formulación para el tratamiento de la LC en humanos. Esto hace que resulte indispensable la utilización de un

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- Nº 745-17

Salta, 13 NOV 2017
Expediente Nº 12.474/17

ANEXO I

modelo lo más parecido posible al humano. Los resultados obtenidos de experimentos in vitro con frecuencia no coinciden con los obtenidos in vivo, de manera que el reemplazo no garantiza en absoluto el éxito del tratamiento si éste no ha sido probado en animales vivos.
Utilizaremos ratones Balb/c ya que estos animales son susceptibles a la LC inducida por *Leishmania amazonensis* y desarrollan la enfermedad de una manera muy similar al paciente humano.
Con respecto al número, se utilizará el número mínimo posible para obtener una estadística significativa:
-Protocolo A: se utilizarán seis grupos de dos animales cada uno, más un grupo control de dos animales, para poder probar seis formulaciones distintas.
-Protocolo B: se utilizarán siete grupos de cinco animales cada uno para cada experimento. Uno de los grupos servirá como control, los otros seis grupos se utilizarán para probar distintas formulaciones. Se realizarán dos experimentos por año.

– **¿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.

Cinco animales por jaula. Los animales sanos se mantendrán separados de los animales infectados. Se utilizarán jaulas estándar (24x17x10.5 cm: largo, ancho y alto, de acero inoxidable). Edad de los animales: 5 semanas (adultos)/20 gr.

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

Dos años desde aproximadamente agosto de 2018 (08/2018-07/2020).

– **¿Cuenta con apoyo veterinario o técnico calificado?**

No **(Especifique** Nombre y Apellido)
SI x

Médica Veterinaria María Celia Mora.

PROYECTO- TITULO:

"***Formulaciones liposomales para el tratamiento tópico de Leishmaniasis cutánea***".

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- Nº 745-17

Salta, 13 NOV 2017
Expediente Nº 12.474/17

ANEXO I

Objetivos de los Experimentos:

El proyecto implica el estudio de la eficacia de diversas drogas incorporadas en vehículos adecuados para tratar la Leishmaniasis Cutánea (humana) en forma tópica.
Se realizarán inicialmente experimentos in vitro (contra parásitos en cultivo, contra una línea de macrófagos murinos infectados) para estudiar la eficacia leishmanicida de diversas formulaciones.
En una segunda etapa, se utilizarán animales con el objeto de alcanzar dos objetivos

a. Estudiar la penetración intra/transepitelial en piel de lesiones tempranas de LC. Las muestras de piel se obtendrán a partir del protocolo A.
b. Estudiar la eficacia in vivo de las diversas formulaciones en ratones que presentan una lesión madura de LC. Para esto se utilizará el protocolo B.

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

Proponemos el estudio de la penetración y eficacia leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de liposomas de tamaño nanométrico cargados con drogas potencialmente anti-Leishmania.

La Leishmaniasis es una de las seis Enfermedades Tropicales Huérfanas más importantes según la Organización Mundial de la Salud, y es endémica en 88 países, incluido el nuestro, en particular en las regiones del Norte de nuestro país. Esta enfermedad permanece categorizada como TDR I, es decir que su estatus es de emergente y fuera de control, remarcando la necesidad de nuevas y mejores herramientas para su diagnóstico, prevención y tratamiento.

Hace corto tiempo se detectó la presencia del vector flebótomo (mosca de la arena) en el norte de la provincia de Córdoba (Salomon 2008), y se reportó un caso de Leishmaniasis Cutánea (LC) autóctona en la localidad de Mendiolaza, provincia de Córdoba (La Voz del Interior, 2014).

Resulta imperioso el desarrollo de nuevos tratamientos debido a la escasez de terapias adecuadas y al desinterés de las empresas farmacéuticas (Dujardin y otros 2008), dado que se trata de una enfermedad que afecta principalmente a poblaciones rurales pobres.

Un tratamiento tópico como el que proponemos desarrollar implica pocos efectos adversos, mejor respuesta de los pacientes, menores costos y es más realizable en un ambiente rural. El desarrollo exitoso de formulaciones tópicas para la LC necesita tanto la elección racional de la droga como del vehículo.

Las ventajas principales de las formulaciones liposomales de uso tópico se deben a su demostrada habilidad de: reducir efectos secundarios que pueden ocurrir debido a una absorción sistémica demasiado alta de la droga; mejorar la acumulación de la droga en el

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- Nº 745-17

Salta, 13 NOV 2017
Expediente Nº 12.474/17

ANEXO I

sitio de administración; incorporar fácilmente una gran variedad de drogas, tanto hidrofílicas como hidrofóbicas (Romero y Morilla 2011, Schäfer-Korting 2009).

Proponemos entre otras cosas estudiar la penetración in vitro en piel de lesiones de LC, ya que hemos observado que existen discrepancias difíciles de explicar entre la capacidad de penetración de formulaciones en piel humana SANA *ex vivo* y la capacidad terapéutica de esas mismas formulaciones en el modelo murino *in vivo*, cuando las formulaciones son aplicadas en lesiones maduras (ulceradas). Pretendemos entender mejor cuáles son los factores que hacen que una formulación sea terapéuticamente exitosa. Finalmente, el modelo más cercano a la situación real del paciente se estudiará por la aplicación de las formulaciones optimizadas en un modelo murino de la enfermedad.

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.**

Protocolo A: Los animales serán inoculados intradermalmente, bajo anestesia, en la base de la cola con *L. amazonensis* una vez al comienzo del protocolo y se permitirá que la lesión progrese durante 3 semanas, hasta el estadio de pápula. Los animales serán sacrificados y se diseccionará un cm cuadrado de piel conteniendo la lesión para estudiar la penetración de las formulaciones *ex vivo*.

Protocolo B: Los animales serán inoculados intradermalmente, bajo anestesia, con parásitos, una vez al comienzo del protocolo. Se permitirá que la lesión progrese durante cinco semanas hasta el estadío de úlcera. En la sexta semana se comenzarán los tratamientos tópicos, una o dos veces al día durante 20 días. En nuestra experiencia los animales no sufren distrés bajo este protocolo de trabajo.

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,

Cristiana T. Trinconi, Juliana Q. Reimão, Adriano C. Coelho, Silvia R. B. Uliana; Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71 (5): 1314-1322. doi: 10.1093/jac/dkv495.

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- Nº 745-17

Salta, 13 NOV 2017
Expediente Nº 12.474/17

ANEXO I

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

En el bioterio del IPE-FCS.

d. Enumere las maniobras y cuidados posteriores de los procedimientos experimentales

Observación regular para signos de distres.

e. Mencione los métodos de apareo y crianza, incluyendo: selección de y edad de los reproductores, edad de destete, etc.
Animales endocriados y destetados a los 21 días.

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:	**Punto final del experimento**
b. Lugar de extracción:	**Del corazón**
c. Cantidad a extraer:	**1 ml como máximo**

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- Nº 745-17

Salta, 13 NOV 2017
Expediente Nº 12.474/17

ANEXO I

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

a. Fase del procedimiento:	**Punto final del experimento**
b. Lugar de extracción:	**Base de la cola**
c. Cantidad a extraer:	**Toda la lesión**

Administración de drogas, tóxicos, u otros durante el procedimiento experimental

	No	Si	Droga	Dosis	Vía	Frecuencia de Administración
Anestésicos		X	%Ketamina/%xilacina	0.025ml/10gr	IP	1 vez al inyectar los parásitos Una vez al momento del punto final del experimento
Analgésicos	--	--				
Sedantes	--	--				
Otros	Formulaciones liposomales conteniendo extractos de plantas africanas (*Bombacopsis buonopozense* seed oil, *Strophanthus gratus* and *S. kombe* seed oils, *Cinnamomum cassia* seed oil, *Citrullus lanatus* seed peptide extract, *Chrysophyllum albidum* cotyledon peptide extract, *Citrus aurantium* seed peptide extract, *Carica papaya* seed peptide extract, *Solanum turvum* fruit extract, *Nauclea latifolia* fruit extract and *Clerodendrum volubile* fruit extract) y anfotericina, miltefosina y bifosfonatos		100 µl de formulación al 0.1-1%	Tópica	Una/dos veces por día durante tres semanas

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- Nº 745-17

Salta, 13 NOV 2017
Expediente Nº 12.474/17

ANEXO I

Los animales serán eutanasiados?	**Si**	**X**	**No**	
Método de eutanasia utilizado	**CO2**			

– 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 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 distrés durante la sobrevida, el punto final ocurrirá ocho semanas luego de inoculado el parásito, es decir luego de tres semanas de tratamiento.

- Disposición de los restos:

Residuos Patológicos X
Freezer
Incineración
Otros

- Riesgos para el personal o para la población animal del Bioterio:

El riesgo es mínimo. Los parásitos no son eliminados por saliva, materia fecal ni orina. La única forma de transmisión es parenteral, por contacto de mucosas o lesiones de la piel con tejido o sangre del animal infectado o por la picadura del vector flebótomo (mosca de la arena) que haya antes picado a un animal infectado.

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			

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- Nº 745-17

Salta, 13 NOV 2017
Expediente Nº 12.474/17

USO DE AGENTES PELIGROSOS:

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

En caso afirmativo, indicar:

Agente	Vía de administración	Volumen final	Concentración
Leishmania amazonensis (M2269)	intradérmica	50 ul	$2x10^7$ cantidad total

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 de la infección y al aplicar los tratamientos. Se considerarán signos de distrés: automutilación, fiebre, anorexia, inmovilidad o presencia de otros signos de dolor que no puedan ser manejados por analgesia.

Inicio de la supervisión	Duración	Frecuencia de la supervisión
Inmediatamente luego de la infección	8 semanas	Diaria

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:
Paola Andrea BARROSO.

D.G.A.A.

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

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SALTA - FACULTAD DE CS. DE LA SALUD

Lic. Maria Silvia Forsyth
Decana
Facultad de Ciencias de la Salud - UNSa