



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 06 de Octubre de 2020

No. Oficio CICUAL – 116-2020

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL
P R E S E N T E

Estimado Dr. Hernández

Este comité ha dictaminado que se **RECIBE Y ACEPTA** el cierre de su proyecto intitulado “EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO E INMUNOMODULADOR DE LA BETA DEFENSINA HUMANA 3(HBD-3) Y LA CATELICIDINA (LL37) EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA” con clave CINVA-PAT-1580-15/19-1. En caso de tener alguna duda o comentario, se lo haremos saber.

Sin más por el momento quedo de usted para cualquier duda o comentario

ATENTAMENTE

DRA. GABRIELA ALEMÁN ESCONDRILLAS
SECRETARIA DEL COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO
DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

Ccp. MVZ. Mariela G. Contreras Escamilla- Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

GAE/bdr

Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C. P. 14080, Alcaldía Tlalpan,
Ciudad de México, México. Tel. (52) 54 87 09 00 www.incmnsz.mx



2020
LEONORA VICARIO
SECRETARÍA DE SALUD





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 31 de agosto del 2020

Dra. Gabriela Alemán Escondrillas
Secretaria del CICUAL
INCMNSZ

Estimado Dr. Barrios:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO E INMUNOMODULADOR DE LA BETA DEFENSINA HUMANA 3 (HBD3) Y LA CATELICIDINA (LL37) EN UN MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA" con no. de registro CINVA-PAT-1580-15/19-1, CINVA 1580 debido a que el protocolo ha concluido. Adjunto al presente productos obtenidos, portada de tesis, acta de examen para obtener grado de Doctor en Ciencias del Med. Octavio Ramos Espinosa, artículo publicado y congresos. Así mismo le hago saber que esta por enviarse otro artículo para su publicación.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dr. Rogelio Hernández Pando
Investigador en Ciencias Médicas F
Departamento de Patología
Sección de Patología Experimental

Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C. P. 14080, Alcaldía Tlalpan,
Ciudad de México, México. Tel. (52) 54 87 09 00 www.incmnsz.mx



2020
LEONORA VICARIO
MÉDICO PIONERA EN LA PATRÍA



**“EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO E INMUNOMODULADOR DE LA
BETA DEFENSINA HUMANA 3 (H β D3) Y LA CATELICIDINA (LL37) EN UN
MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA”**

FOLIO DE REGISTRO: PAT-1580-15/17-1

Elaborado por: Octavio Ramos Espinosa

INTRODUCCIÓN

Los actuales regímenes de tratamiento para la TB consisten en la administración de múltiples antibióticos por periodos prolongados (6-18 meses), presentando con frecuencia efectos adversos importantes en pacientes, condicionando abandono terapéutico, recaídas y aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR-TB) y extremadamente resistentes (XDR-TB). Por ello es necesario buscar nuevas alternativas terapéuticas que sean cortas, inocuas, efectivas.

Los péptidos antimicrobianos (AMPs), como la catelicidina (LL37) y las β defensinas humanas (H β D's) son moléculas catiónicas características de la inmunidad innata con propiedades microbicidas e inmunorreguladoras, que surgen como parte de la segunda línea de la inmunidad innata contra agentes infecciosos como *Mycobacterium tuberculosis*. Su papel en la TB experimental se ha descrito previamente:

En el modelo de TB progresiva con ratones BALB/c se ha demostrado una alta expresión de β defensina 2 murina (m β D2), principalmente a los 14 días de infección, seguido por un descenso gradual desde el día 21 hasta el 60. La mayor expresión de éste péptido coincide con la formación de granulomas y una máxima producción de citocinas de tipo Th1, mientras que durante la fase avanzada estos péptidos dejan de expresarse en coexistencia con mayor crecimiento bacilar y daño tisular, lo cual sugiere que estas participan en el control del crecimiento bacteriano. De la misma forma, en el modelo de TB progresiva, CRAMP (análogo murino de la catelicidina humana) incrementó su producción de forma considerable en la etapa temprana. Al día 60 postinfección (pi) se observó carga bacteriana incrementada, extensa neumonía y disminución de la expresión de este péptido. En modelos de infección crónica similar a la TB latente (TBL), las catelicidinas y defensinas se mantienen expresadas de forma constante, sugiriendo su participación en el mantenimiento de la infección latente. Este fenómeno se mantiene hasta la presencia de algún estímulo supresor de la respuesta inmune. Debido a lo anterior, se ha propuesto que los AMPs son excelentes candidatos inmunoterapéuticos para ser empleados en TB. Sin embargo, la administración exógena de AMPs conlleva desventajas como la degradación enzimática tras ser administrados y el alto costo de producción, siendo útil la expresión de estos a través de vectores.

Los adenovirus (Ad) han sido utilizados como vectores de transferencia que contienen y expresan genes con propósitos terapéuticos. Los adenovirus de primera generación carecen de los cassettes de expresión temprana E3, esenciales para la replicación y codificación de proteínas involucradas con la evasión de la respuesta inmune. En el espacio eliminado puede acomodarse un gen de interés, de un tamaño variable

entre 5-8 kB. Estos vectores tienen un gran tropismo por el epitelio respiratorio, favoreciendo su uso en modelos murinos de infecciones respiratorias. Una vez que son captados por las células blanco, los adenovirus son eliminados del organismo después de algunos días, por lo que la expresión de la citocina es transitoria. Este tipo de terapia génica surge como una herramienta terapéutica prometedora para la infección por cepas drogo sensibles y resistentes a antibióticos antituberculosos.

En este proyecto se utilizarán 3 Ad que expresan β -defensina humana 3, catelicidina (AdH β D3 y AdLL37) y el adenovirus control AdGFP. El efecto inmunoterapéutico fue evaluado en modelos murinos de TB pulmonar progresiva, infección crónica similar a la latente (TBL) y convivencia / transmisibilidad. En el modelo de TB progresiva se evaluó adicionalmente el efecto sinérgico de la administración de adenovirus recombinantes con un tratamiento de primera y segunda línea contra cepas sensibles y resistentes a antifímicos. Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad y 22 gr de peso proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ) como sigue:

MODELO	INFECCIÓN: CEPA Y NO. DE BACTERIAS	GRUPOS	CINÉTICA DE SACRIFICIO (DÍAS POSTRATAMIENTO)	NO. DE RATONES SACRIFICADOS POR GRUPO	NO. RATONES TOTALES
TB PROGRESIVA H37Rv	H37Rv 250 000 bacterias	- AdH β D3 - AdLL37 - AdGFP - PBS (4 GRUPOS)	7, 14, 28, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	240 + REP= 480
TB PROGRESIVA H37Rv (tratamiento con antibióticos)	H37Rv 250 000 bacterias	- AdH β D3 + Antibiótico - AdLL37 + Antibiótico - AdGFP + Antibiótico - Antibiótico solo (4 GRUPOS)	7, 14, 28, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	240 + REP= 480
TB PROGRESIVA MDR	MDR 250 000 bacterias	- AdH β D3 - AdLL37 - AdGFP - SS (4 GRUPOS)	7, 14, 28, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	240 + REP= 480
TB PROGRESIVA MDR (tratamiento con antibióticos)	MDR 250 000 bacterias	- AdH β D3 + Antibiótico - AdLL37 + Antibiótico - AdGFP + Antibiótico - Antibiótico solo (4 GRUPOS)	7, 14, 28, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	240 + REP= 480

TB LATENTE	H37Rv 4000 bacterias	- AdH β D3	60 (1 SACRIFICIO)	20	80 + REP= 160
		- AdLL37			
		- AdGFP			
		- SS (4 GRUPOS)			
TRANSMISIBILIDAD	5186 250 000 bacterias	- AdH β D3	60 (1 SACRIFICIO)	20	100 + REP= 200
		- AdLL37			
		- AdGFP			
		- INH			
		- SS (5 GRUPOS)			
					GRAN TOTAL
					*2280 RATONES

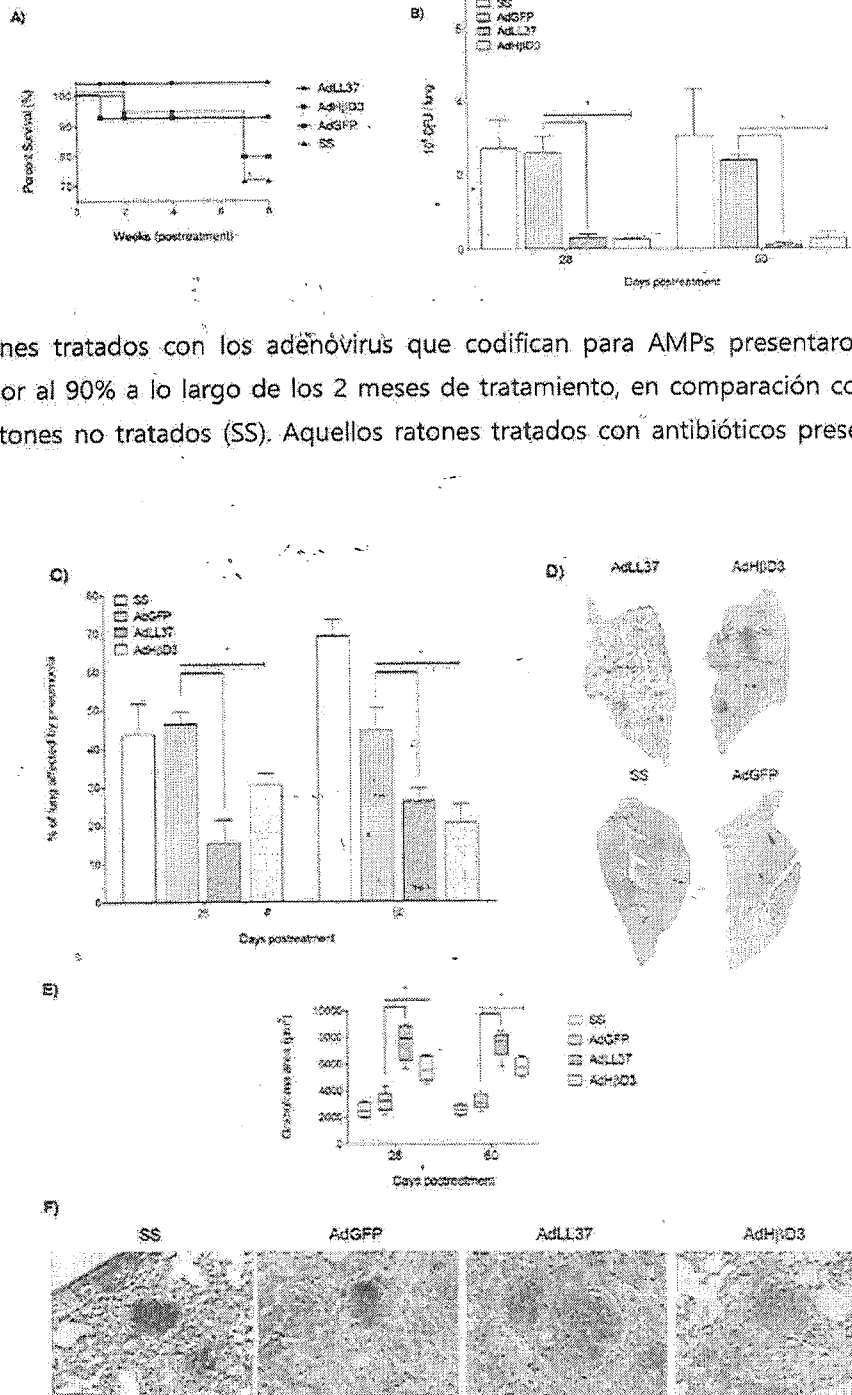
* De los 1880 ratones solicitados para el proyecto, se utilizaron 400 ratones adicionales debido a que no pudimos replicar el modelo de TB progresiva con la cepa MDR.

RESULTADOS

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ADENOVIRUS AdLL37 y AdH β D3 EN EL MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA CON LA CEPA H37RV

Se realizaron 2 experimentos independientes para evaluar el efecto terapéutico de la administración de los adenovirus recombinantes AdH β D3, AdLL37 y AdGFP (vacío) en la fase progresiva de la enfermedad. Las curvas de supervivencia evidenciaron el papel terapéutico de AdLL37 y AdH β D3, al mantenerse un 100% de supervivencia de los individuos infectados tras la administración de los vectores. Aproximadamente el 20% de los ratones infectados a los cuales se les administró el adenovirus vacío AdGFP, murieron a los 2 meses postratamiento. En ratones infectados con la cepa de *Mtb* H37Rv, la administración de una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37 disminuyeron significativamente la carga bacteriana en los días 14, 28 y 60 postratamiento, con respecto a el adenovirus vacío AdGFP. El análisis histológico de los pulmones en los días 14, 28 y 60 mostró resultados congruentes con la carga bacteriana, reflejados como una disminución en el porcentaje de neumonía de ratones tratados con AdH β D3 y AdLL37.

Figure 3



Los ratones tratados con los adenovirus que codifican para AMPs presentaron un porcentaje de supervivencia superior al 90% a lo largo de los 2 meses de tratamiento, en comparación con un 70% por parte del grupo de ratones no tratados (SS). Aquellos ratones tratados con antibióticos presentaron un 100% de supervivencia.

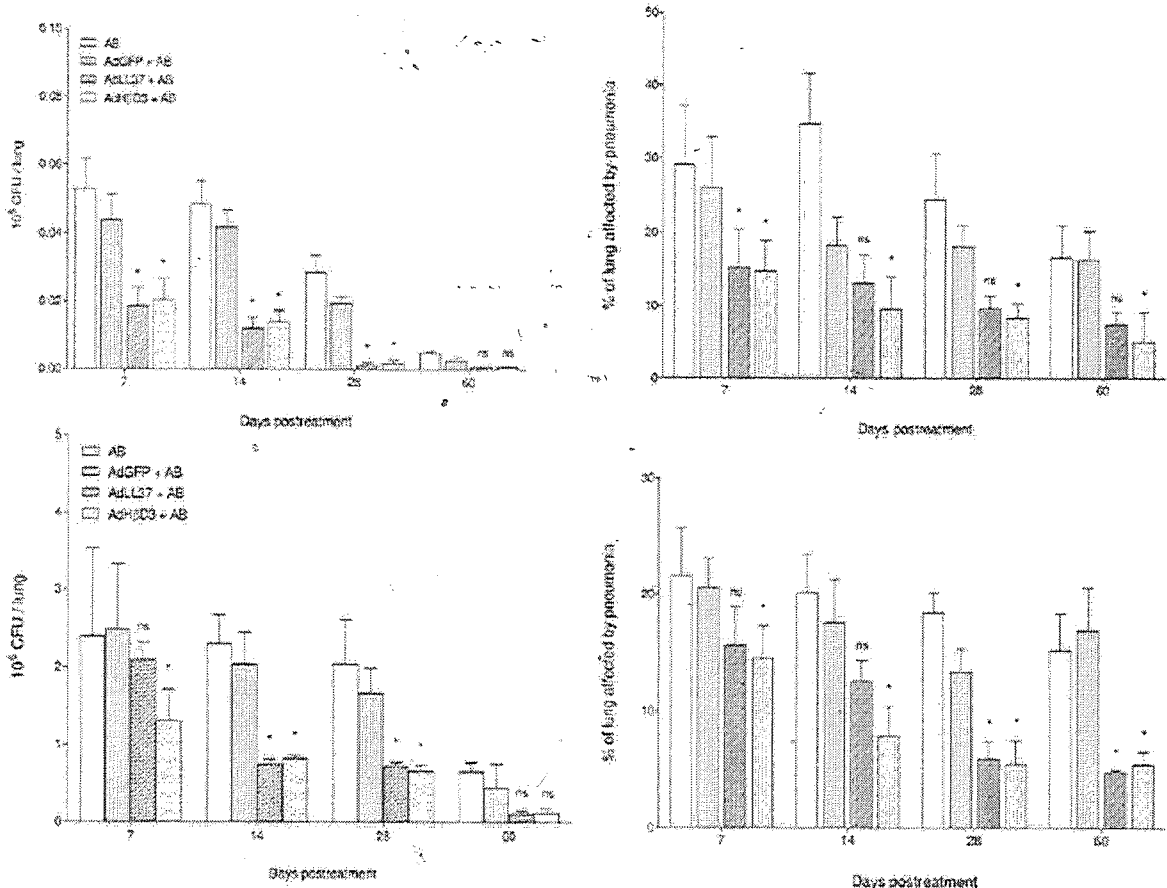
PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE RATONES INFECTADOS CON LA CEPA Mtb H37Rv (250 000 UFC VÍA INTRATRAQUEAL). EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS DE AdH β D3, AdLL37 O AdGFP EN LA TB PROGRESIVA CON LA CEPA DE Mtb H37Rv. La administración de una sola dosis de Ad que expresan AMPs disminuyen significativamente la carga bacteriana y el daño por neumonía en ratones infectados con una alta dosis de la cepa H37Rv. Los resultados son representativos de 3 experimentos con tres

ratones por grupo. Los datos son expresados como promedios con su desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ADENOVIRUS AdLL37 Y AdH β D3 EN CONJUNTO CON TRATAMIENTO ANTIFÍMICO DE PRIMERA LÍNEA EN EL MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA.

La administración de una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37, en conjunto con la administración de antibióticos de primera línea para TB, logró disminuir la carga bacteriana de forma considerable desde el día 7 postratamiento. Esta tendencia se mantuvo a lo largo de la cinética de sacrificios; sin embargo, sólo el grupo de ratones tratados con AdH β D3 tuvo una disminución estadísticamente significativa.

Figure 5

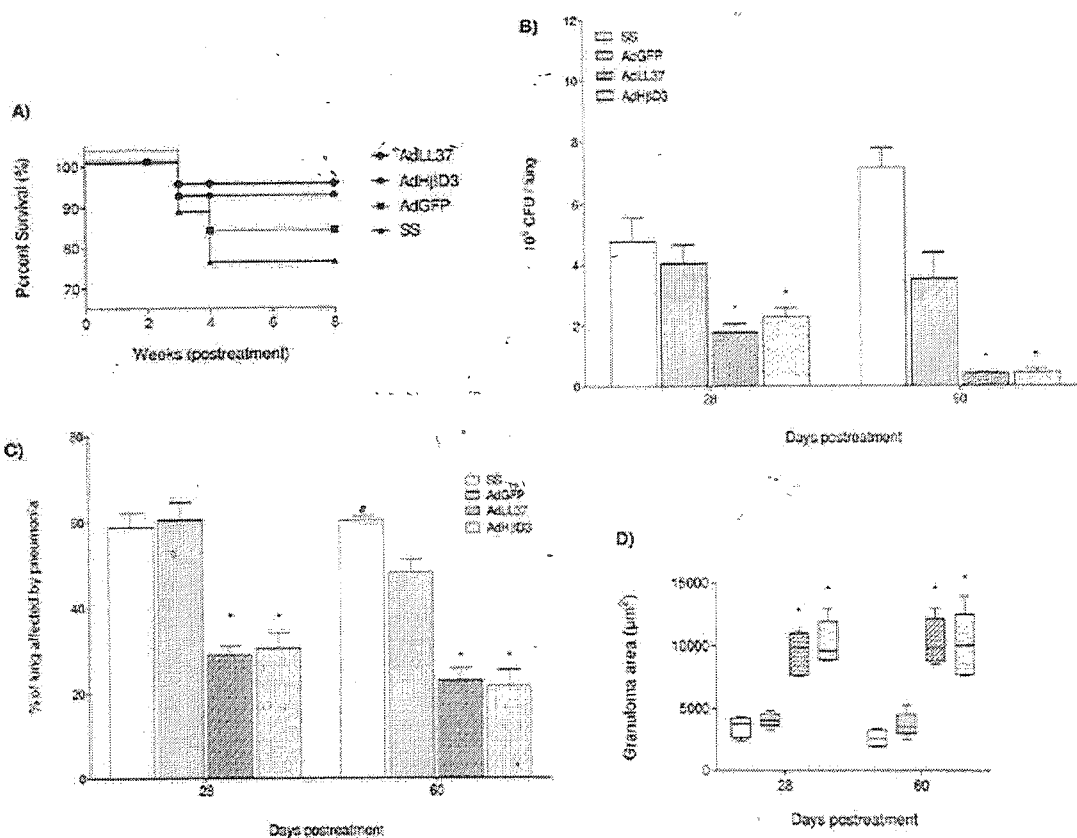


EFFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES AdH β D3, AdLL37 Y AdGFP EN CONJUNTO CON ANTIBIÓTICOS DE PRIMERA Y SEGUNDA LÍNEA PARA TB. El tratamiento sinérgico basado en la administración de adenovirus recombinantes y antibióticos de primera o segunda línea tienen una alta eficacia en la disminución de la carga bacteriana a partir de la primer semana postratamiento. La reducción del daño pulmonar fue mucho más evidente en el grupo AdH β D3 + Ab en los primeros 14

días postratamiento. Los datos son expresados como promedios con su desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ADENOVIRUS AdLL37 y AdH β D3 EN EL MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA CON LA CEPA MDR

La administración de una sola dosis de AdH β D3 o AdLL37 (5×10^7 pfu) en ratones infectados con la cepa MDR redujo significativamente la carga bacteriana y el daño por neumonía en los días 28 y 60 postratamiento con respecto al grupo control AdGFP.

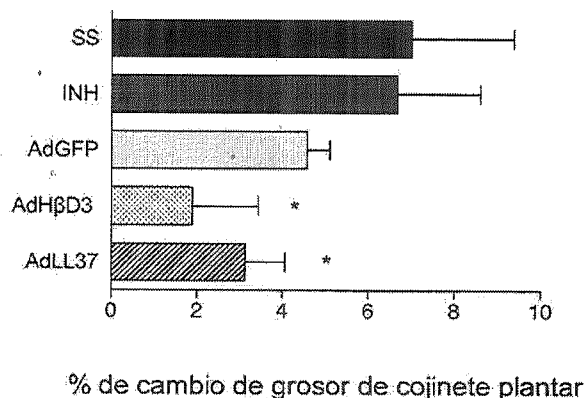
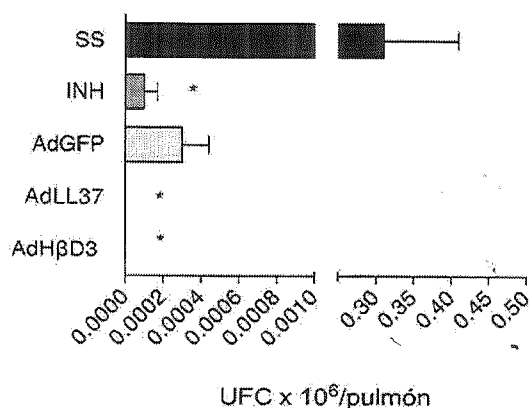


EFFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS DE AdH β D3, AdLL37 O AdGFP EN LA TB PROGRESIVA CON UN AISLADO CLÍNICO MDR. La administración de los adenovirus recombinantes AdH β D3, AdLL37 y AdGFP, reducen la carga bacteriana a partir del día 28 postratamiento con una sola dosis, sin embargo, solo aquellos que codifican para AMPs muestran diferencia significativa. Al día 60 este fenómeno es más evidente para los grupos terapéuticos. La disminución de el daño por neumonía es congruente con la reducción de la carga bacteriana. Los resultados son representativos de 3 experimentos con tres ratones por grupo. Los datos son expresados como promedios con su desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$.

El empleo de antibióticos de segunda línea en conjunto con los adenovirus recombinantes mostró una disminución considerable de la carga bacteriana en los días 14 y 28 postratamiento. Los ratones tratados con antibióticos de segunda línea administrados con una sola dosis de AdHβD3 presentaron un menor número de bacterias cultivables en tiempos más tempranos (día 7). Al día 60 postratamiento no existió una diferencia significativa en la disminución de la carga bacteriana del tratamiento combinado de adenovirus (Ad + Ab) y antibióticos con respecto al tratamiento con antibióticos (Ab) solos como monoterapia. La evaluación histológica de los pulmones obtenidos de ratones tratados evidenció menor área neumónica para ambos adenovirus terapéuticos en combinación con antibióticos de segunda línea; sin embargo, el grupo de AdHβD3 + Ab presentó menor carga bacteriana en los días 7, 14, 28 y 60 postratamiento.

EFFECTO PREVENTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN DE AdLL37 y AdHβD3 EN LA TRANSMISIÓN DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR.

Grupos de ratones fueron tratados con una sola dosis de AdLL37, AdHβD3, AdGFP, INH diario intragástrico o solución salina (SS) y se mantuvieron en el mismo microaislador con ratones infectados con la cepa hipervirulenta y altamente transmisible 5186. A los dos meses de convivencia, los ratones tratados fueron sacrificados para determinar la carga bacteriana pulmonar. Un día antes del sacrificio, se inoculó una dosis de PPD en el cojinete plantar de los ratones convivientes no infectados para determinar la reactividad al derivado proteico de Mtb. Se evidenció que los ratones tratados con AdHβD3 y AdLL37 presentaron un menor porcentaje de cambio de cojinete plantar con respecto a su medición basal, en comparación con los grupos controles. Los ratones tratados con AdHβD3 y AdLL37 no presentaron UFC cuantificables, mientras que aquellos ratones tratados con AdGFP, INH o SS presentaron carga bacteriana detectable en diferentes grados, siendo este último el grupo con mayor número de UFCs. Estos datos son representativos de dos experimentos independientes con 10 ratones por grupo.



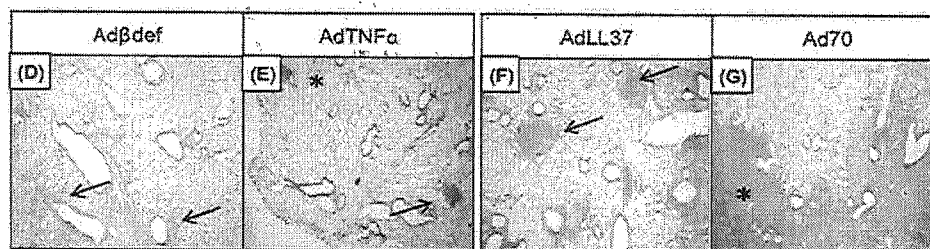
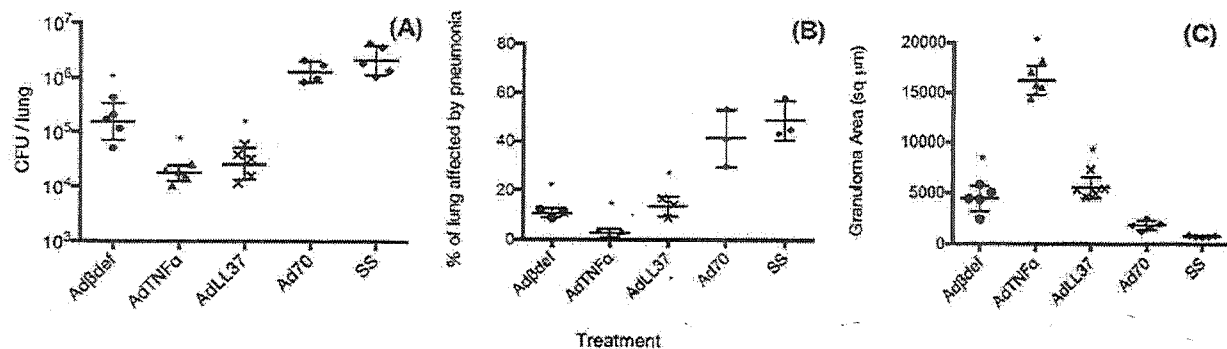
EFFECTO PREVENTIVO DE LA TRANSMISIÓN POR LA ADMINISTRACIÓN DE AdH β D3 Y AdLL37 EN CONVIVIENTES NO INFECTADOS.

(A) Grupos de ratones no infectados fueron tratados con una sola dosis de AdH β D3, AdLL37, AdGFP, INH o SS. Tras un periodo de convivencia de 2 meses con ratones infectados con una cepa hipervirulenta y altamente transmisible (5186), se realizó la medición de la DTH en convivientes no infectados, y expresada como cambio en el porcentaje del grosor del cojinete plantar. (B) Carga bacteriana pulmonar de ratones convivientes no infectados. Los datos son representativos de dos experimentos independientes y expresados como promedios con su desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$.

Los resultados anteriores fueron utilizados para la escritura del manuscrito: *"Immunotherapeutic effect of adenovirus encoding antimicrobial peptides in experimental pulmonary tuberculosis"*, enviado a la revista *Human Gene Therapy*. (Se anexa versión preliminar del manuscrito)

EVALUACIÓN DEL EFECTO PREVENTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN DE AdLL37 y AdH β D3 EN LA REACTIVACIÓN DE LA INFECCIÓN CRÓNICA SÍMILAR A LA TBL.

Después de inducir la supresión del sistema inmune a través de la administración de corticosterona en el agua de bebida de los ratones, estos fueron sacrificados y las muestras biológicas fueron utilizadas para determinar, en primer lugar, la carga bacteriana. El grupo de ratones tratados con una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37 (5×10^7 pfu) presentaron significativamente menor carga bacteriana en comparación con el grupo de ratones administrados con el vector vacío (Ad70).



EFFECTO PREVENTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN DE AdHβD3 Y AdLL37 EN LA REACTIVACIÓN DE LA TB CRÓNICA SIMILAR A LA TBL. (A) Carga bacteriana posterior a la inducción de la reactivación con corticosterona. La disminución del número de bacterias en ratones tratados con adenovirus que codifican para AMPs es significativamente menor que el adenovirus vacío control (Ad70). (B) Porcentaje de neumonía posterior a la inducción de la reactivación de la enfermedad. (C) Para la cuantificación del área de granulomas se tomaron por lo menos 3 campos de 5 diferentes ratones de cada adenovirus o grupo control. (D-G) Características histológicas representativas. El grupo Ad70 muestra grandes áreas de neumonía (asterisco). En contraste los ratones tratados con AdHβD3 mostraron discreta inflamación perivascular y peribronquial; o aquellos tratados con AdLL37 presentan cúmulos de células inflamatorias alrededor de vasos sanguíneos (flechas). Los tejidos fueron teñidos con hematoxilina/eosina (magnificación x 2500). Los datos son expresados como promedios con su desviación estándar; asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$.

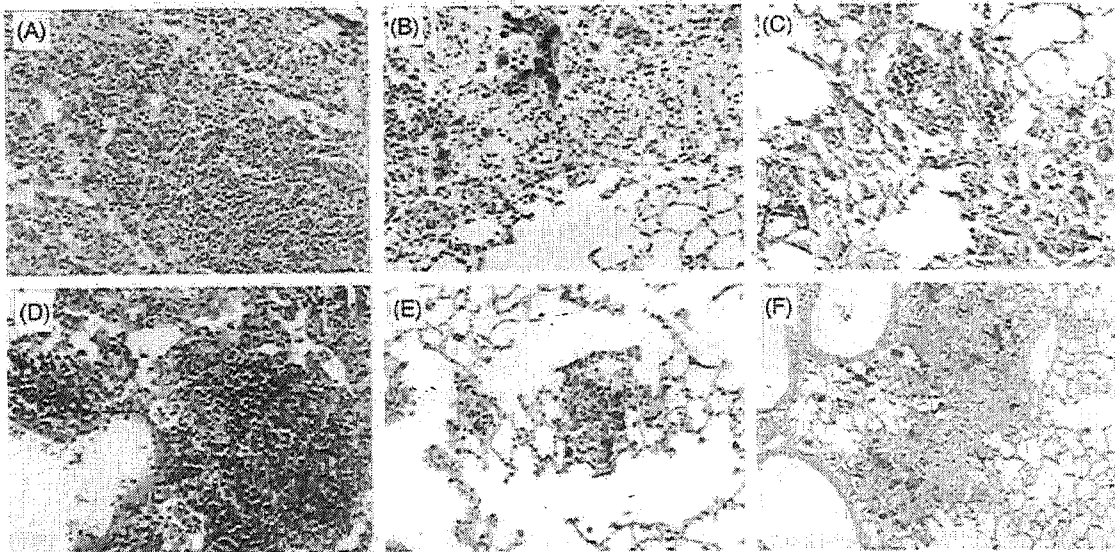
El análisis histológico de los pulmones obtenidos 2 meses posterior a la administración de los adenovirus recombinantes y un mes posterior a la inducción de la inmunosupresión con corticosterona mostró una disminución estadísticamente significativa de el porcentaje de neumonía en ratones tratados con AdHβD3 y AdLL37. La presencia de un mayor número y tamaño de granulomas fue evidente para ambos grupos a evaluar.

Para poder evaluar el efecto de la administración de los distintos adenovirus recombinantes en la inmunidad innata y adaptativa, se determinó la expresión y el número de células positivas para TNFα, IFNγ e iNOS por inmunohistoquímica y morfometría automatizada, respectivamente.

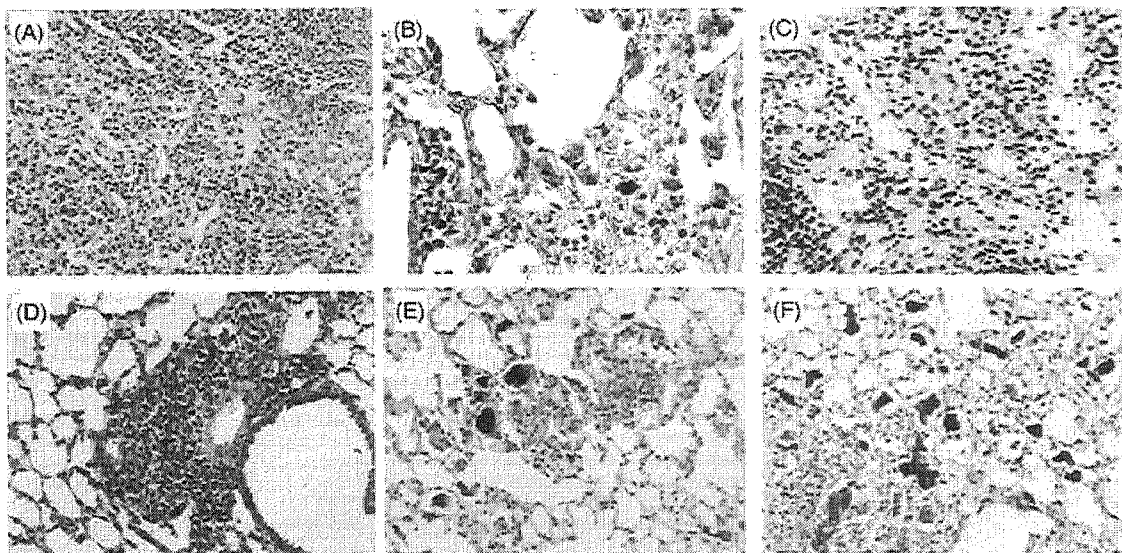
Aquellos animales tratados con AdLL37 o AdHβD3 presentaron intensa positividad para los respectivos AMPs en macrófagos de áreas neumónicas y en el intersticio alveolocapilar, confirmando la expresión adecuada de los AMPs por parte de los adenovirus recombinantes. Las zonas correspondientes a infiltrados perivascuales mostraron una importante positividad para IFNγ. De la misma forma, los macrófagos localizados en

granulomas y áreas de neumonía presentaron positividad para TNF α e iNOS. Los ratones control presentaron discreta positividad para las citocinas antes mencionadas.

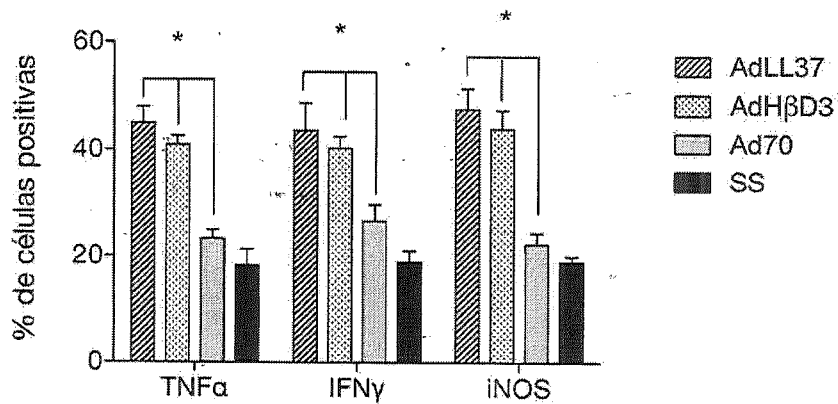
La cuantificación por medio de morfometría automatizada demostró un incremento de 2 veces el número de células positivas en ratones tratados con AdH β D3 o AdLL37 con respecto al grupo de animales control.



MICROGRAFÍAS DE INMUNOHISTOQUÍMICAS REPRESENTATIVAS DE PULMONES DE RATONES INFECTADOS CON *Mtb* Y TRATADOS CON AdLL37. (A) Pulmones provenientes de grupos tratados con Ad70 mostrando negatividad para LL37. (B) En contraste, los macrófagos presentes en áreas neumónicas presentan marca intensa para LL37. (C) Las mismas áreas presentan positividad para TNF α . (D) Abundantes linfocitos en la periferia de vasos sanguíneos muestran marca intensa para IFN γ . (E) Los granulomas presentes contienen abundantes macrófagos con marcaje positivo para iNOS. (F) Área de neumonía en parches también mostraron intensa inmunotinción para iNOS.



MICROGRAFÍAS DE INMUNOHISTOQUÍMICAS REPRESENTATIVAS DE PULMONES DE RATONES INFECTADOS CON *Mtb* Y TRATADOS CON AdH β D3. (A) Ratones tratados con Ad70 no mostraron positividad para H-D3. (B) Algunos macrófagos en áreas de neumonía presentan positividad para H-D3. (C) Estas áreas presentan numerosos macrófagos con positividad para TNF α . (D) Aquellos linfocitos alrededor de vasos sanguíneos y vías aéreas presentan intensa positividad para IFN γ . Los macrófagos localizados en granulomas (E) y áreas de neumonía (F) también presentaron positividad importante para iNOS.



PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA TNF α , IFN γ E iNOS EN RATONES TRATADOS CON DIFERENTES ADENOVIRUS. Se midieron tres áreas de neumonía al azar para determinar el número de células positivas y negativas por inmunohistoquímica y morfometría automatizada en 5 ratones diferentes de cada uno de los grupos. El porcentaje de células positivas fue determinado para cada citocina indicada. Los datos son expresados como promedios con su desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$.

Los ratones B6D2F1 (C57BL/6J / DBA/2J) fueron comprados de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA)

Los resultados obtenidos sobre el efecto preventivo de los adenovirus recombinantes en la reactivación de la TBL ya han sido publicados:

- Ramos-Espinosa O, Hernández-Bazán S, Francisco-Cruz A, Mata-Espinosa D, Barrios-Payán J, Marquina-Castillo B, et al. Gene therapy based in antimicrobial peptides and proinflammatory cytokine prevents reactivation of experimental latent tuberculosis. *Pathog Dis* (2016) 74(7).

Dr. Rogelio Hernández Pando
 Investigador en Ciencias Médicas F
 Departamento de Patología
 Sección de Patología Experimental



RESEARCH ARTICLE

Gene therapy based in antimicrobial peptides and proinflammatory cytokine prevents reactivation of experimental latent tuberculosis

Octavio Ramos-Espinosa¹, Sujhey Hernández-Bazán¹, Alejandro Francisco-Cruz¹, Dulce Mata-Espinosa¹, Jorge Barrios-Payán¹, Brenda Marquina-Castillo¹, Fernando López-Casillas², Marta Carretero^{3,4}, Marcela del Río^{3,4} and Rogelio Hernández-Pando^{1,*}

¹Section of Experimental Pathology, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, México City, México, ²Department of Cell Biology, Cellular Physiology Institute, National Autonomous University of México, México City, México, ³Epithelial Damage, Repair and Tissue Engineering, Ciemat-Fundación Marcelino Botín, Complutense University, Madrid, Spain and ⁴IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

*Corresponding author: Section of Experimental Pathology, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15 Colonia Belisario Domínguez Sección XVI Delegación Tlalpan CP 14080, México City, México. Tel: +52-55 54 85 34 91; Fax: +52-55 54 85 34 91; E-mail: rhdezpando@hotmail.com

One sentence summary: Gene therapy in the form of recombinant adenovirus encoding proinflammatory cytokine or antimicrobial peptide is a potentially useful system to prevent reactivation of latent tuberculosis.

Editor: Patrick Brennan

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) latent infection can lead to reactivation. The design of new strategies to prevent it is an important subject. B6D2F1 mice were infected intratracheally with a low dose of *Mtb* H37Rv to induce chronic infection. After 7 months, mice were treated with one dose of recombinant adenoviruses encoding TNF α , β defensin-3 and LL37. Immunosuppression was induced 1 month later with corticosterone. In comparison with the control group, mice treated with adenoviruses showed significantly less bacterial load and pneumonia, the adenoviruses encoding TNF α and LL37 being the most efficient. Gene therapy based in a proinflammatory cytokine or antimicrobial peptides is a potentially useful system to prevent reactivation of latent tuberculosis.

Keywords: innate immunity; latent tuberculosis; gene therapy; antimicrobial peptides; proinflammatory cytokine; experimental models

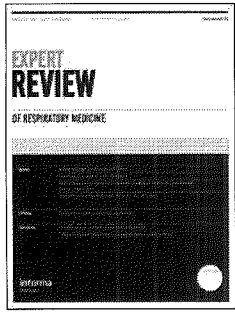
INTRODUCTION

With more than 1.5 million deaths annually in the world, tuberculosis (TB) is the leading cause of death by a single infec-

tious agent in the history of humanity, and one of the most important causes of mortality in adults infected with human immunodeficiency virus (World Health Organization (WHO) 2014). *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), the main causal agent of TB, is

Received: 3 March 2016; Accepted: 27 July 2016

© FEMS 2016. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com



The use of immunotherapy for the treatment of tuberculosis

Octavio Ramos-Espinosa, León Islas-Weinstein, Marco Polo Peralta-Álvarez, Manuel Othoniel López-Torres & Rogelio Hernández-Pando

To cite this article: Octavio Ramos-Espinosa, León Islas-Weinstein, Marco Polo Peralta-Álvarez, Manuel Othoniel López-Torres & Rogelio Hernández-Pando (2018) The use of immunotherapy for the treatment of tuberculosis, Expert Review of Respiratory Medicine, 12:5, 427-440, DOI: [10.1080/17476348.2018.1457439](https://doi.org/10.1080/17476348.2018.1457439)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/17476348.2018.1457439>



Accepted author version posted online: 26 Mar 2018.
Published online: 27 Mar 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 105



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

REVIEW



The use of immunotherapy for the treatment of tuberculosis

Octavio Ramos-Espinosa^a, León Islas-Weinstein^a, Marco Polo Peralta-Álvarez^{a,b}, Manuel Othoniel López-Torres^a and Rogelio Hernández-Pando^a

^aSection of Experimental Pathology, Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México City, México; ^bLaboratory of Immunochemistry, Department of Immunology, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México City, México

ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis (TB) is the first cause of mortality by a single infectious agent in the world, causing more than one million deaths worldwide as reported by the World Health Organization (WHO). For the optimal control of TB infection, a protective immune response that limits bacterial spread without causing damage to the host is essential. Although most healthy individuals are capable of generating protective responses, patients who suffer pulmonary TB commonly present a defective immune function.

Areas covered: We intend to highlight the potential of novel immunotherapeutic strategies that enhance and promote effective immune responses. The following methodology was undertaken for establishing a literature search: the authors used PubMed to search for 'Pulmonary Tuberculosis' and keywords that denoted the novel immunotherapeutic strategies discussed in length in the text including antibodies, antimicrobial peptides, cell therapy, cytokines and gene therapy.

Expert commentary: The current therapeutic regimens for this disease are complex and involve the prolonged use of multiple antibiotics with diverse side effects that lead to therapeutic failure and bacterial resistance. The standard appliance of immunotherapy and its deployment to vulnerable populations will require coordinated work and may serve as a powerful tool to combat the ensuing threat of TB.

ARTICLE HISTORY

Received 8 January 2018
Accepted 22 March 2018

KEYWORDS

Antibodies; antimicrobial peptides; cell therapy; cytokines; gene therapy; pulmonary tuberculosis

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) that has a wide variety of clinical scenarios, of which pulmonary TB is the most frequent. In 2016, 10.4 million new cases of active TB and 1.3 million deaths were reported [1]. Hence it is one of the 10 leading causes of death in developing countries and the leading cause of death in patients coinfecting with HIV [2]. In response to this problem, several measures have been implemented by the WHO, which contributed to produce a slow decrease in the incidence of TB since 1990 (1.5% per year) and a reduction of 47% in total mortality [3]. However, the global elimination of TB in the coming decades seems implausible. One of the most important reasons of this problem is the multiple limitations of current pharmacological treatment, although it is effective against most cases of drug-sensitive TB; the need for its prolonged use and high toxicity [4,5] as well as the socio-economic conditions of the patients have resulted in a constant abandonment of treatment and the emergence of multidrug-resistant TB (MDR-TB) strains [6,7]. Despite the recent development of some useful drugs for TB caused by MDR strains, cases of resistance to these new medications have already been reported [8–10]. The discovery and application of immunotherapies to improve the protective immune response in infectious diseases remains a promising field and pulmonary

TB is not the exception [11–13]. In this review, we intend to highlight the different types of immunotherapy based on experimental results obtained basically in murine models of pulmonary TB, that we consider that have a high potential for its later evaluation and use to prevent reactivation in persons with latent infection or to shorten chemotherapy in patients with active TB.

2. The immune response in TB

The immune response in pulmonary TB, a fine-tuned interaction of diverse innate and adaptive immune cells and molecules, is shaped by genetic and environmental factors of the bacteria and the host.

Mtb is generally transmitted through small inhaled particles coughed from an individual with active pulmonary TB. These particles enter the airways, where they can reach bronchial and alveolar epithelial cells that generate protective immune responses against Mtb infection mainly through the production of antimicrobial peptides (AMPs) (surfactant lipid monolayer, defensins), and through priming of other subsets of specialized innate immune cells including mucosal-associated invariant T cells (MAIT), natural killer (NK) T cells, and $\gamma\delta$ lymphocytes [14,15]. The recruitment of dendritic cells (DCs) to the site of infection and the later priming of naïve T cells



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

ACTA DE EXAMEN

Ciudad Universitaria, a 16 días del mes de octubre de 2019 se celebró el examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, que sustentó **CE** **CE** de nacionalidad mexicana, registrado con el número de cuenta **300841066**, quien cursó los estudios en el periodo comprendido de **2014 a 2018-2**, y cumplió con los requisitos académicos señalados en el plan de estudios correspondiente, presentado la tesis: **"Efecto inmunoterapéutico e inmunomodulador de la β -defensina humana 3 (H β D3) y la catelicidina (LL37) en la tuberculosis pulmonar murina"**
Dirigida por el: Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando

El Comité Académico del Programa designó el jurado, formado por los profesores que a continuación se mencionan y que fungieron como:

- Presidente: Dr. Ricardo Lascurain Ledesma
- Vocal: Dña. Martha Torres Rojas
- Vocal: Dr. Raúl Mancilla Jiménez
- Vocal: Dr. Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos
- Secretario: Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando

Al término del examen el jurado resolvió: aprobarlo

Se dio por concluido el acto académico con las firmas de los sinodales que en él intervinieron.

Ó

Ó

Presidente

Secretario

Ó

Ó

Ó


Vocal

Vocal

Vocal

"Por mi raza hablará el espíritu"

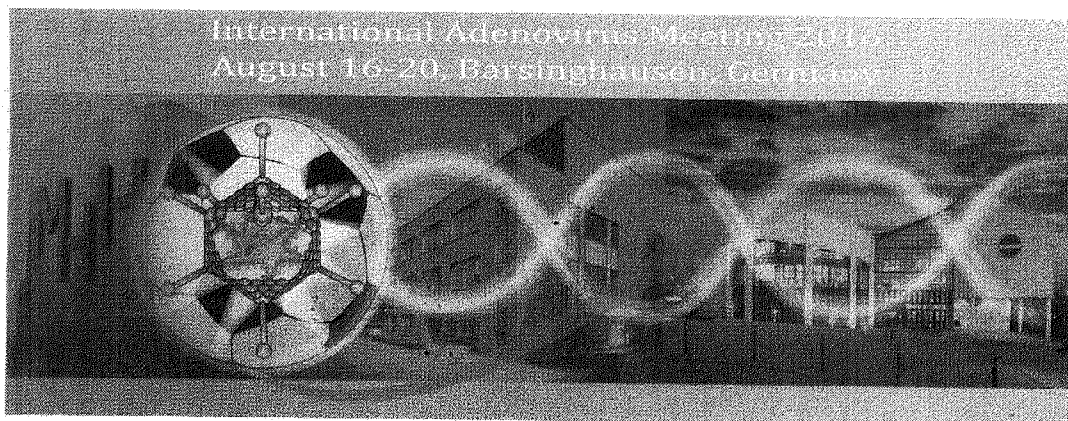
La suscrita, Coordinadora del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, certifica que las firmas son auténticas y corresponden al jurado designado.


DRA. AUREA OROZCO RIVAS
COORDINADORA
DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS
COORDINACIÓN

Por la Dirección General de Administración Escolar

Jefe del Departamento de Exámenes y Títulos Subdirector de Control Documental

5143012219078



Certificate of Attendance

CE

has attended the 12th International Adenovirus Meeting (IAM) held in
Barsinghausen, Germany on August 16th- 20th, 2016

Ö

PD Dr. med. Albert Heim
Organizer/Host
Institute of Virology
Hannover Medical School

The Organizing Committee

Albert Heim, Anja Ehrhardt, Florian Kühnel, Thomas Dobner, Thomas Speiseder



Gordon Research Conferences

frontiers of science

visit us on the web at <http://www.grc.org>

Certificate of Participation

03/04/2017

CE

National Institute of Medical Science and Nutrition
Salvador Zubiran
Experimental Pathology Department
Vasco de Quiroga 15 Seccion 16 Delegacion
Tlalpan
Mexico City, 14080
Mexico

This is a certificate of participation for:

Conference: Antimicrobial Peptides
Dates: 02/26/2017 - 03/03/2017
Location: Four Points Sheraton / Holiday Inn Express in Ventura CA United States

This letter certifies your participation as a Poster Presenter at the Gordon Research Conference on Antimicrobial Peptides held 02/26/2017 - 03/03/2017 at Four Points Sheraton / Holiday Inn Express in Ventura CA United States.

Presented poster titled: Gene therapy based in antimicrobial peptides for experimental tuberculosis

Dr. Nancy Ryan Gray, President and Chief Executive Officer
Gordon Research Conferences

Ó



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd., Mx a 23 de julio de 2020.

No. Oficio CICUAL/033/20

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
Presente.

Estimado Dr. Hernández:

Por este conducto le informo que la vigencia de su proyecto intitulado: "EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO E INMUNOMODULADOR DE LA BETA DEFENSINA HUMANA 3(HBD-3) Y LA CATELICIDINA (LL37) EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA", con registro CINVA-PAT-1580-15/19-1 finalizó el 09 de junio de 2020, por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar al CICUAL el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. Formato de cierre
2. Informe final
3. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

ATENTAMENTE

DRA. GABRIELA ALEMÁN ESCONDRILLAS
SECRETARIA DEL COMITÉ INTERNO DE CUIDADO Y
USO DE ANIMALES DE LABORATORIO.

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

GAE/bdr

Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C. P. 14080. Alcaldía Tlalpan,
Ciudad de México, México. Tel. (52) 54 87 09 00 www.incmnsz.mx



2020
LEONÁ VICARIO
PROFESORA INVESTIGADORA DE LA PATRIA





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Venado

2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Ciudad de México a 5 de julio de 2019.

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora CICUAL
INCMNSZ
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

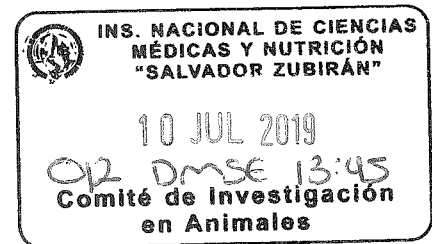
En respuesta a su oficio no. CICUAL-130-19 en el que me solicita el cierre del proyecto intitulado: "EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO E INMUNOMODULADOR DE LA BETA DEFENSINA HUMANA 3 (H β D3) Y LA CATELICIDINA (LL37) EN UN MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA" con no. de registro PAT-1580-15/19-1, hago de su conocimiento que el proyecto aún se encuentra vigente dado que se solicitó por cuatro años y de acuerdo a la carta de aprobación fechada 9 de junio de 2016 aún está vigente (se adjunta copia). Cabe mencionar que el trabajo se encuentra en escritura para su publicación.

Adjunto al presente informe de avances, productos de investigación derivados del proyecto.

Sin más por el momento me despido con cordiales saludos.

Atentamente,

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
Investigador en Ciencias Médicas F
Departamentò de Patología
Sección de Patología Experimental.



C.c.p: M. V. Z. Mariela Contreras Escamilla - Jefa del DIEB

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México., a 9 de junio de 2016.

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
Depto. Patología Experimental
Presente.

REF: CINVA-1580 PAT-1580-15/19-1

Estimado Dr. Hernández:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Efecto inmunomodulador de la Beta defensina humana 3 (HBD) y la catelicidina (LL37) en la tuberculosis pulmonar murina”

Este comité ha dictaminado **APROBARLO con una observación**. Y se autoriza el uso de 1880 ratones Balb/c.

Mencionan ratones B6D2F1 y en el documento no vuelven a aparecer. Los investigadores han respondido adecuadamente. No. de animales: 940 ratones BALB/C x 2 = 1880 (ya está incluido el 10% por posibles pérdidas).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
Avenida Vasco M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB
Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

NAB/nom



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



ACUSE

Ciudad de México a 28 de junio de 2019.

No. Oficio CICUAL-130-19



2019 AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR EMILIANO ZAPATA

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
Departamento de Patología Experimental.
Presente.

Estimado Dr. Hernández.:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del Protocolo: "EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO E INMUNOMODULADOR DE LA BETA DEFENSINA HUMANA 3(HBD-3) Y LA CATELICIDINA (LL37) EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA." con registro PAT-1580-15/19-1; finalizó en agosto de 2017. Debido a que el periodo de realización ha concluido, le solicito de la manera más atenta lleve a cabo el cierre del proyecto y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. Formato de cierre del protocolo, el cual adjunto, este debe de ir en hoja membretada e impreso.
2. Informe final
3. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

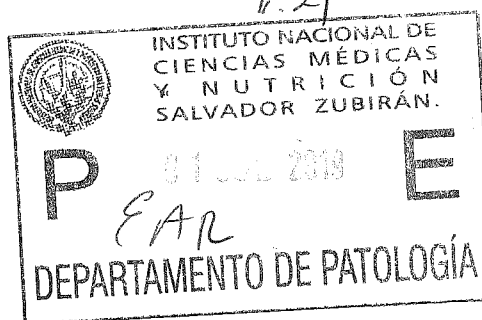
c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB ✓

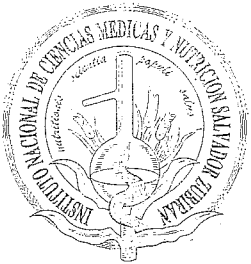
NABS/bdr

2442 11:05

7 JUN 2019
DmSE

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

acvs e

Ciudad de México., a 9 de junio de 2016.

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
Depto. Patología Experimental
Presente.

REF: CINVA-1580 PAT-1580-15/19-1

Estimado Dr. Hernández:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Efecto inmunomodulador de la Beta defensina humana 3 (HBD) y la catelicidina (LL37) en la tuberculosis pulmonar murina”

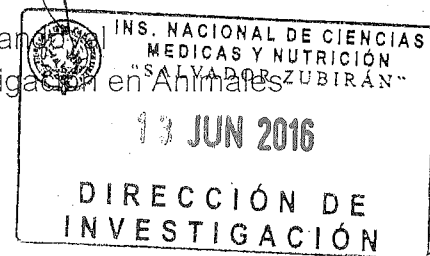
Este comité ha dictaminado **APROBARLO** con una observación. Y se autoriza el uso de 1880 ratones Balb/c.

Mencionan ratones B6D2F1 y en el documento no vuelven a aparecer. Los investigadores han respondido adecuadamente. No. de animales: 940 ratones BALB/C x 2 = 1880 (ya está incluido el 10% por posibles pérdidas).

Sin más por el momento quedo de usted.

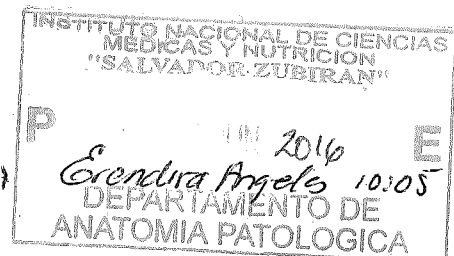
Atentamente,
[Handwritten Signature]

Dra. Norma A. Bobadilla Sanjurjo
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
Avenida Vasco Quiroga No. 15
Colonia Delisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52) 54870900
www.incmnsz.mx

NAB/nom





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



México D.F. a 23 de mayo de 2016.

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval.
Presidente del Comité de Investigación
P r e s e n t e.

Por medio de este conducto envío respuesta a las observaciones hechas por la CINVA al presente protocolo Titulado:

“Efecto inmunomodulador de la Beta defensina humana 3 (HBD) y la catelicidina (LL37) en la tuberculosis pulmonar murina” Segunda vez”. **CINVA-1580, PAT-1580-15/19-1,**

Revisor 2
El formato de apoyo está incompleto:

Punto 5: No se especifica cómo se calculó el tamaño de la muestra por lo tanto no se justifica el gran número de animales que están solicitando.

De acuerdo a la metodología descrita en el protocolo en extenso, se calcularon un total de 12 ratones por día de sacrificio. Esto tomando en cuenta que: 6 ratones se destinarán para llevar a cabo la cuantificación de la carga bacilar, 3 ratones para el estudio histológico y 3 más para realizar técnicas de biología molecular (q-PCR). Desafortunadamente, debido a la metodología que cada técnica requiere, no es posible compartir las muestras. Las muestras destinadas para la cuantificación de carga bacteriana son homogenizadas con PBS tween, imposibilitando su uso para extracción de ácidos nucleicos. De la misma forma, aquellos pulmones perfundidos con etanol no pueden ser utilizados para llevar a cabo otras técnicas. Por lo tanto, este es el número mínimo de animales que se requiere no solo para obtener las muestras necesarias y poder obtener una diferencia estadísticamente significativa, así mismo, es el mínimo requerido para poder publicar los resultados. Se solicita un 10% adicional de animales para el caso de las pérdidas durante el experimento. También consideramos los ratones necesarios para llevar a cabo una repetición en un periodo no mayor a 2 años.

Punto 15: No se describen los criterios para establecer punto final humanitario.

Para establecer el punto final humanitario se tomarán en cuenta los siguientes parámetros: Caquexia, taquipnea, adinamia, piloerección y postura encorvada.

Punto 17: No se define el nivel de bioseguridad de los animales.

Manejo de desechos y medidas de bioseguridad:

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52) 54870900
www.incmnsz.mx

El NIH ha designado a los adenovirus como organismos del Grupo de Riesgo 2 (agentes que pueden inducir enfermedad en humanos, rara vez es grave y para las que las intervenciones preventivas o terapéuticas a menudo están disponibles)[1] que deben trabajarse en un nivel mínimo de bioseguridad 2 (BSL2)[2]. Los animales utilizados para los estudios relacionados con adenovirus deben ser alojados en cajas ventiladas bajo presión negativa y aire suministrado a través de filtros HEPA y manipulados bajo Bioseguridad Animal Nivel 2 [2].

Los procedimientos de generación y utilización de adenovirus se realizarán dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad III. Al final de cada procedimiento, la superficies de trabajo, todo el material y los desechos que tuvieron contacto con adenovirus serán inactivados con Clidox™ 1:1:18 partes de agua/15min (este desinfectante es mas efectivo que el cloro y no daña el acero inoxidable), estos organismos son susceptibles a la acción del cloro y se recomienda que las superficies de trabajo se limpien con cloro al 10% por 10 minutos [2] dentro del gabinete de bioseguridad, para sacarse del gabinete se colocarán en bolsa roja resistente al proceso de esterilización (121°C/21lbs/20min) marcada con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO INFECCIOSOS".

Para el transporte de agentes patógenos (adenovirus o micobacterias) del laboratorio de patología experimental a las instalaciones en el DIEB, los viales se colocan en bolsa burbuja rodeada de material absorbente y se coloca un refrigerante dentro de un contenedor plástico diseñado para llevar muestras biológicas de forma segura para todos los modos de transporte (Bio-Bottle, tapa anaranjada de altura 23cm por 12cm de diámetro, con capacidad de 2.5L) etiquetado con el símbolo de sustancia infecciosa y el nombre del patógeno[3].

Todos los procedimientos en donde se utilicen micobacterias, se realizarán dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad III en las instalaciones de patología experimental en el DIEB del INCMNSZ. El material de cama que esta en contacto con los ratones infectados con micobacterias y tratados con adenovirus se maneja dentro de gabinetes de flujo laminar con nivel de bioseguridad III, el aserrín es depositado en bolsa roja resistente al proceso de esterilización (121°C/21lbs/20min), marcada con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO INFECCIOSOS", de igual manera los cadáveres de los ratones, se colocarán en otra bolsa de iguales características, etiquetada con la fecha y número de ratones, para el mismo proceso de esterilización. Una vez completado el ciclo de esterilización la bolsa roja que contiene los cadáveres se colocará dentro de una bolsa de plástico amarilla marcada con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO INFECCIOSOS", la cual será trasladada al depósito temporal de RPBI's del instituto.

REFERENCIAS:

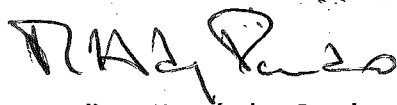
1. Guide to Biosafety at Vanderbilt conducting research with n.d.;2:322–2057. www.safety.vanderbilt.edu.
2. Lentivirus Biosafety Information and Handling Guidelines n.d. <http://www.cyagen.com/media/uploads/adenovirus-handling-biosafety-considerations->

guidelines.pdf.

3. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Public Heal Serv 1999;5th Editio:1-250. doi:citeulike-article-id:3658941.

Sin más por el momento me despido agradeciendo su atención a la presente.

Atentamente,



Dr. Rogelio E. Hernández Pando
Investigador Responsable
Departamento de Patología
Sección de Patología Experimental.

C.c.p: Dr. Gerardo Gamba Ayala – Director de Investigación
M. V. Z. Mariela Contreras Escamilla – Jefa del DIEB



ause

**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

Ciudad de México a 15 de Abril de 2016.

Dr. Rogelio Hernández Pando
Depto. Patología Experimental
Presente

REF: CINVA-1580 PAT-1580-15/19-1

Estimado Dr. Hernández.:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Efecto inmunomodulador de la Beta defensina humana 3 (HBD) y la catelicidina (LL37) en la tuberculosis pulmonar murina”.

Este comité ha dictaminado dejar **PENDIENTE** la aprobación hasta que se aclaren las siguientes observaciones:

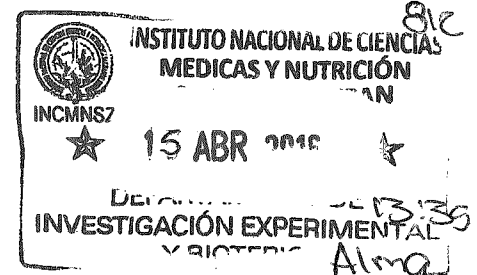
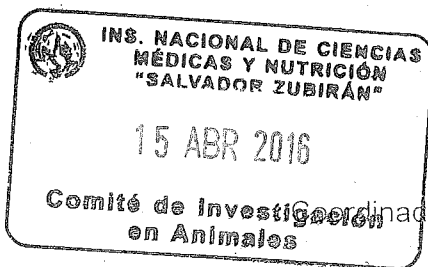
1. El formato de apoyo está incompleto:
Punto 5: No se especifica cómo se calculó el tamaño de la muestra por lo tanto no se justifica el gran número de animales que están solicitando.
Punto 15: No se describen los criterios para establecer punto final humanitario.
Punto 17: No se define el nivel de bioseguridad de los animales.

Debido a que el sistema Latis dejó de funcionar, le solicitamos que su respuesta al comité y el protocolo modificado sea entregado en forma impresa y el pdf por vía electrónica a los correos: norma.bobadillas@incmnsz.mx y navelort@hotmail.com.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

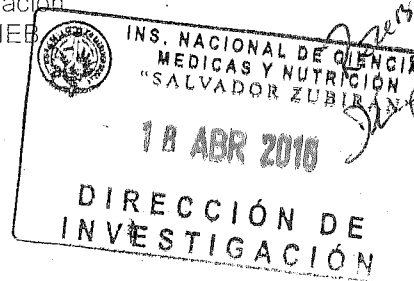
Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

NAB/nom





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

revisión 13-Abril

1580

México D.F. a 8 de febrero de 2016.

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval.

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales.

Presente.

En atención a las recomendaciones emitidas por la CINVA para el Protocolo de Investigación Experimental Títulado:

“EFECTO INMUNOMODULADOR DE LA BETA DEFENSINA HUMANA 3 (HBD) Y LA CATELICIDINA (LL37) EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA”

Observaciones:

1. Si el proyecto no cuenta con financiamiento aún, se sugiere que el título se especifique la cepa y el sexo de la especie de ratones que se utilizarán.

- Debido a que el proyecto no cuenta con financiamiento, se decide modificar el título al siguiente:

“Efecto inmunoterapéutico e inmunomodulador de la Beta defensina humana-3 (HBD-3) y la catelicidina (LL-37) en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva, latencia y transmisibilidad en ratones BALB/c y B6D2F1”

2.- Justificar el uso de los 3 adenovirus y definir claramente las dosis que utilizarán y si han sido utilizadas previamente.

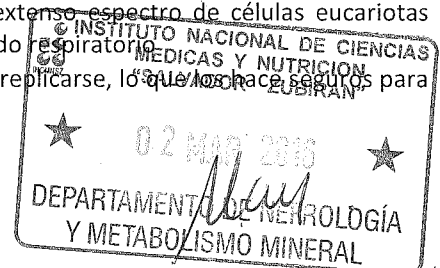
- De acuerdo con lo reportado en la literatura:

Los adenovirus han sido utilizados como vectores de transferencia que contienen y expresan genes con propósitos terapéuticos (1). Los adenovirus que fueron utilizados son clasificados como de primera generación, cuya manipulación genética eliminó las regiones tempranas E1 y E3, esenciales para la replicación y codificación de proteínas involucradas con la evasión de la respuesta inmune (2). En el espacio deletado puede acomodarse un transgén, que se introduce por ligación enzimática o por recombinación homóloga. La generación y propagación de partículas víricas con genoma deficiente en E1 y E3 se lleva a cabo mediante transfección en líneas celulares que han incorporado establemente las regiones virales indispensables deletadas (células 293 o células 911). En estas células se completa el ciclo lítico y en el medio de cultivo se recogen los adenovirus recombinantes. (3)

Los adenovirus presentan varias ventajas como vectores de transfección:

- Son muy eficientes para infectar células in vitro e in vivo.
- Infectan con igual eficiencia células quiescentes o replicativas.
- Tienen un amplio tropismo y capacidad para infectar un extenso espectro de células eucariotas procedentes de distinto tejido o especie, principalmente tejido respiratorio.
- La expresión del transgén es transitoria y no son capaces de replicarse, lo que los hace seguros para su uso.

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



- No se integran al genoma por lo que se evita el riesgo de mutaciones por inserción, por lo cual son inocuos.
- Son producidos eficientemente en altos títulos (mayor a 10^{11} pfu).

Los adenovirus recombinantes tienen un gran tropismo por el epitelio respiratorio, favoreciendo su uso en nuestro modelo. Una vez que son captados por las células blanco, los adenovirus son eliminados del organismo después de algunos días, por lo que la expresión de la citocina es transitoria. (4,5)

La terapia génica en los modelos de TB pulmonar experimental surge como una herramienta terapéutica prometedora. La sobreexpresión de citocinas protectoras claves en la infección con TB se propone como una terapia adyuvante en el control y prevención de la enfermedad. La administración única de adenovirus recombinantes que sobreexpresan Interferón- γ (AdIFN γ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (AdGM-CSF) han demostrado lo previamente mencionado.

Bajo el conocimiento de que IFN- γ tiene un importante papel como citocina protectora en la fase inicial de la TB pulmonar, la administración de AdIFN γ en la fase crónica de la enfermedad generó una disminución significativa de la carga bacteriana y del área neumónica con respecto al adenovirus vacío. Éste mismo tratamiento contribuyó para la organización y formación de granulomas de mayor tamaño y cantidad. Tras la administración conjunta de AdIFN γ con quimioterapia convencional, los resultados obtenidos tuvieron mayor contundencia: menor carga bacteriana y menor neumonía con respecto al tratamiento solo con adenovirus. Resultados similares fueron obtenidos al utilizar un modelo de TB progresiva con un aislado clínico resistente a primera línea de antibióticos (MDR). (6).

Con una estrategia experimental similar, se utilizó un adenovirus recombinante que sobreexpresa el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Ésta es una citocina pleiotrópica con capacidad reguladora de la respuesta inflamatoria induciendo la diferenciación y activación de DC's. Como se ha reportado previamente, en modelos de TB experimental existe un retraso en el reclutamiento y maduración de DC's, contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune por parte de Mtb (7). Los resultados observados reflejaron una inmunidad protectora incrementada con activación rápida de DC's, incremento en la producción de IFN- γ , TNF- α y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), permitiendo el control eficiente del crecimiento bacteriano y de el daño histológico por neumonía, con generación de mayor número de granulomas y de mayor tamaño con respecto al adenovirus vacío. El mismo tratamiento fue efectivo en la prevención de la reactivación de la infección crónica murina similar a la TB latente y en la transmisión (8). De acuerdo a lo anterior, se puede evidenciar que el producto terapéutico (GM-CSF ó IFN- γ) de los adenovirus tiene un impacto importante en la resolución de la enfermedad.

En este proyecto se utilizarán 2 adenovirus que expresan β -defensina humana 3 y catelicidina (AdBdef y AdLL37) respectivamente. Esto es basado en la actividad antimicrobiana e inmunomoduladora que han demostrado ambos péptidos, por lo que se espera una disminución de carga bacteriana y lesión pulmonar en ratones tratados. El adenovirus control (vacío) se denomina AdGFP. AdBdef, AdLL37 y AdGFP fueron construidos con la misma metodología que los antes mencionados, por lo que tienen un comportamiento similar.

Nuestro modelo emplea dosis de adenovirus similares a las empleadas en los experimentos antes mencionados. Adicionalmente, se han realizado experimentos para evaluar el efecto histológico de 3 diferentes dosis de adenovirus (alta, media y baja) encontrándose únicamente infiltrados inflamatorios peribronquiales leves en días tempranos, resolviéndose a los 7 días sin evidenciar daño histológico en ninguna de las 3 dosis. Se decide utilizar una dosis de **5.47×10^7 pfu/ml (media)** de acuerdo a la eficacia en la producción del péptido y menor daño histológico.



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

3. Se sugiere realizar una tabla o esquema que justifique los grupos experimentales y la línea de tiempo para que sea claro la distribución de los ratones que se solicitan. Así mismo, se sugiere que se entregue un plan de trabajo en donde se aclare cómo se solicitarán los ratones en el tiempo de estudio que se propone.

MODELO	INFECCIÓN: CEPA Y No. DE BACTERIAS	GRUPOS	CINÉTICA DE SACRIFICIO (DÍAS POSTRATAMIENTO)	No. DE RATONES SACRIFICADOS POR GRUPO	No. RATONES TOTALES	FECHA DE ENTREGA DE RATONES
TB PROGRESIVA	H37RV 250 000 bacterias	- Ad-H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - PBS (4 GRUPOS)	7, 15, 30, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	240	Marzo 2016
TB PROGRESIVA (tratamiento con antibióticos)	H37RV 250 000 bacterias	- Ad-H β D3 + Antibiótico - AdLL-37 + Antibiótico - Antibiótico solo (3 GRUPOS)	7, 15, 30, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	180	
TB PROGRESIVA (cepa MDR)	MDR 75 000 bacterias	- Ad-H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - PBS (4 GRUPOS)	7, 15, 30, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	240	Septiembre 2016
TB LATENTE	H37Rv 4000 bacterias	- Ad-H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - PBS (4 GRUPOS)	60 (1 SACRIFICIO)	20	80	Diciembre 2016
TRANSMISIBILIDAD	5186 250 000 bacterias	- Ad-H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - INH - PBS (5 GRUPOS)	30 Y 60 (2 SACRIFICIOS)	20 (10 RATONES INFECTADOS Y 10 RATONES NO- INFECTADOS)	200	
					GRAN TOTAL 940 RATONES	Consideramos una repetición con la misma cantidad de ratones en un periodo no mayor a 2 años.

Los modelos de TB progresiva con la cepa H37Rv pueden ser manejados de forma simultánea, por lo que de primera instancia se requieren **420 ratones**. Posteriormente se requerirá un grupo de ratones para la cepa MDR (**240 ratones**) y finalmente los ratones correspondientes a los modelos de TB latente y de transmisibilidad (**280 ratones**). Una vez concluidos los experimentos, se llevará a cabo la repetición de los mismos.

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

4. Corrección de la dosis de pentobarbital para eutanasia.

La dosis correcta para eutanasia es: Pentobarbital 210mg/kg vía intraperitoneal, dosis única.

Referencias:

1. Graham FL. Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells. *Immunol Today*. 2000; 21:426-428.
2. He TC, Zhou S, Da Costa L, Yu Jian, Kinzler KW, Vogelstein. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* .1998; 95: 2509-2514.
3. Fallaux FJ et al. Characterization of 911: A New Helper Cell Line for the Titration and Propagation of Early Region 1-Deleted Adenoviral Vectors. *Hum Gene Ther*.1996; 7:215-222.
4. Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*. 2000.81, 2573-2606.
5. Alba R, Bosch A, Chillón M. Gutless adenovirus: last generation adenovirus for gene therapy. *Gene therapy*. 2005;12: 518-527.
6. Mata-Espinosa DA, Mendoza-Rodríguez V, Aguilar-León D, Rosales R, López-Casillas F, Hernández-Pando R. Therapeutic effect of recombinant adenovirus encoding interferon-gamma in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Mol Ther* 2008; 16:1065-72.
7. Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Barrios-Payan J, Hernandez-Pando R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another hematopoietic growth factor. *Med Oncol*. 2014 Jan;31(1):774.
8. Francisco-Cruz A, Mata-Espinosa D, Estrada-Parra S, Xing Z, Hernández Pando R. Immunotherapeutic effects of recombinant adenovirus encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 171: 283-297.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente



Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
Dpto. Patología y Anatomía Patológica
Sección de Patología Experimental
P. A. Dr. Jorge Alberto Barrios Payán

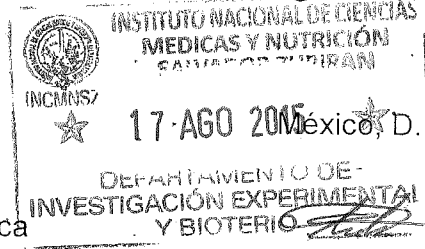
c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Depto. De Investigación Experimental y Bioterio

Acuse



2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



México, D. F., a 14 de Agosto del 2015.

Dr. Rogelio Hernández Pando
Depto. Patología y Anatomía Patológica
Presente.

REF: CINVA-1580 PAT-1580-15/19-1

Estimado Dr. Hernández:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Efecto inmunomodulador de la Beta defensina humana 3 (H3D) y la catelicidina (LL37) en la tuberculosis pulmonar murina”

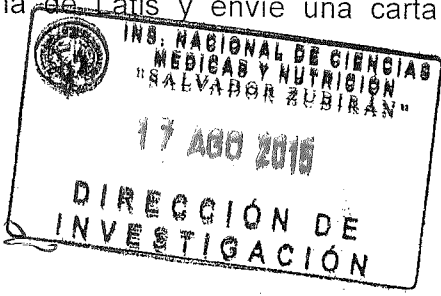
Este comité ha dictaminado dejar **Pendiente** la aprobación hasta que se aclaren las siguientes **Observaciones**:

1. Si el proyecto no cuenta con financiamiento aún, se sugiere que en el título se especifique la cepa y el sexo de la especie de ratones que utilizarán.
2. Justificar el uso de los tres adenovirus y definir claramente las dosis que utilizarán y si han sido utilizadas previamente.
3. Se sugiere realizar una tabla o esquema que justifique los grupos experimentales y la línea de tiempo para que sea claro la distribución de los aproximadamente 1968 ratones que se solicitan. Asimismo, se sugiere que se entregue un plan de trabajo en donde se aclare cómo se solicitaran los 1920 ratones en los cuatro años de estudio que se propone.
4. Corregir la dosis de pentobarbital para eutanasia.
5. Se recomienda que responsable del proyecto se ponga en contacto con la jefatura del DIEB para programar la producción y entrega del número ratones solicitados

Es importante que las correcciones las hagan en el Sistema de Latis y envíe una carta

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

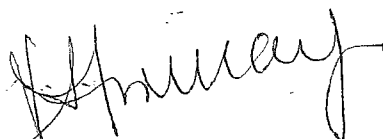
Recibido
R. A. R.



especificando la respuesta a cada punto solicitado. La respuesta al comité y el protocolo modificado en el sistema Latis deberá entregarse en forma impresa y el pdf por vía electrónica a los correos: norma.bobadillas@incmnsz.mx y nayelort@hotmail.com.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,



Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio

NAB/nom



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO
DE PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 07/05/2015

CLAVE: PAT-1580-15/17-1

TÍTULO: EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO E INMUNOMODULADOR DE LA BETA DEFENSINA HUMANA-3 (H?D-3) Y LA CATELICIDINA (LL-37) EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA

INVESTIGADOR RESPONSABLE: HERNANDEZ PANDO ROGELIO

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 03/08/2015 al 31/08/2017

Trimestre 1

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 0.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 0.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)			
Materiales	\$ 0.00		
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)			
Animales	\$ 0.00		
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)			
Estudios	\$ 0.00		
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)			
Viaticos	\$ 0.00		
(reuniones científicas y trabajo de campo)			
Publicaciones	\$ 0.00		
costo directos de publicación, sobreregistro)			
		FIRMAS	
		investigador responsable	Jefe de Departamento
		Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
		Director de Investigación	Director General
			Fecha de resolución
			4-JUL 2016



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México., a 9 de junio de 2016.

~~Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando~~
~~Depto. Patología Experimental~~
Presente.

REF: CINVA-1580 PAT-1580-15/19-1

Estimado Dr. Hernández:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Efecto inmunomodulador de la Beta defensina humana 3 (HBD) y la catelicidina (LL37) en la tuberculosis pulmonar murina”

Este comité ha dictaminado **APROBARLO** con una observación. Y se autoriza el uso de 1880 ratones Balb/c.

Mencionan ratones B6D2F1 y en el documento no vuelven a aparecer. Los investigadores han respondido adecuadamente. No. de animales: 940 ratones BALB/C x 2 = 1880 (ya está incluido el 10% por posibles pérdidas).

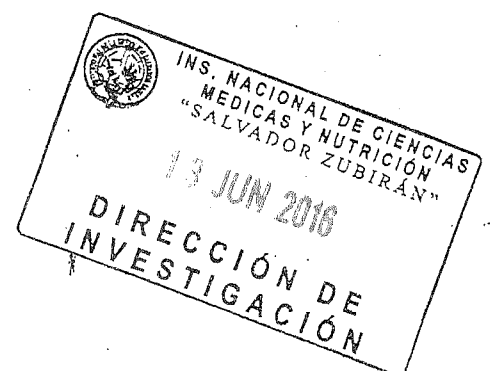
Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB
Avenida Vasco Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52) 54870900
www.incmnsz.mx

NAB/nom





**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

No. CINVA: 1580

FOLIO DE REGISTRO: 'PAT-1580-15/17-1'

Fecha de registro del Protocolo: 23 de mayo de 2016

Título del Protocolo: "Efecto inmunoterapéutico e inmunomodulador de la Beta defensina humana-3 (H β D-3) y la catelicidina (LL-37) en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva, latencia y transmisibilidad en ratones BALB/c y B6D2F1"

Propuesta: a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dr. Rogelio Hernández Pando
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental
Teléfono	54870900 ext. 2185, 2194 y 7126
Correo electrónico	Ô

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Dra. Dulce A. Mata Espinosa	INCMNSZ, Depto. de Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental	Doctor	54870900 ext. 2185 y 2194	Ô
Dra. Brenda N. Marquina Castillo	INCMNSZ, Depto. de Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental	Doctor	54870900 ext. 2185 y 2194	Ô
Dr. Jorge A. Barrios Payán	INCMNSZ, Depto. de Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental	Doctor	54870900 ext. 2185 y 2194	Ô

--



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE	INCMNSZ, Depto. de Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental	Doctorado	5548609611	Ô

Vigencia del Protocolo.			
		Mes	Año
Fecha estimada de inicio del protocolo		Agosto	2016
Fecha tentativa de finalización.		Agosto	2017

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

1) Institución en donde se realizará el proyecto:
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran". Departamento de Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental.

2) **Objetivos Generales y específicos del protocolo:**
Evaluar la H β D-3 y LL-37 en su efecto inmunomodulador e inmunoterapéutico en la TB pulmonar murina:
-Evaluar el efecto inmunoterapéutico de la sobreexpresión de la β -defensina y la Catelicidina en la fase progresiva de la tuberculosis pulmonar murina.
-Evaluar la sobreexpresión de la β -defensina y la Catelicidina en la prevención de la reactivación de la infección crónica murina similar a la tuberculosis latente.
-Evaluar la sobreexpresión de la β -defensina y la Catelicidina en la prevención a corto plazo de la transmisión de *M. tuberculosis* en convivientes sanos.
-Evaluar el efecto inmunoterapéutico de la sobreexpresión de H β D-3 y LL-37 en sinergia con tratamiento convencional con Isoniazida, Rifampicina y Pirazinamida en la fase progresiva del modelo murino de TB pulmonar.
-Evaluar el efecto inmunoterapéutico de la sobreexpresión de H β D-3 y LL37 en la fase progresiva del modelo murino de TB pulmonar con una cepa multidrogoresistente (MDR).



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

El tratamiento para la TB es por periodos prolongados (6-18 meses) con diversos antibióticos, presentando con frecuencia efectos colaterales importantes, condicionando abandono terapéutico, recaídas y aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR-TB) y extremadamente resistentes (XDR-TB) que complica el control de la enfermedad, por ello es necesario buscar nuevas alternativas que sean cortas, inocuas, efectivas.

Los péptidos antimicrobianos (AMP's), como la Catelicidina (LL37) y las defensinas (HBD's) son moléculas catiónicas características de la inmunidad innata con propiedades microbicidas e inmunorreguladoras que surgen como respuesta de primera línea ante agentes infecciosos. Su papel en la TB experimental se ha descrito previamente:

En el modelos de TB progresiva con ratones BALB/c se ha demostrado una alta expresión de β defensina 2 murina (m β D-2), principalmente a los 14 días de infección, seguido por un descenso gradual en los días 21 y 28. La mayor expresión de éste péptido coincide con la formación de granulomas y una máxima producción de citocinas de tipo Th1, mientras que durante la fase avanzada estas dejan de producirse en coexistencia con mayor crecimiento bacilar y daño tisular, lo cual sugiere que estas participan en el control del crecimiento bacteriano. De la misma forma, en el modelo de TB progresiva, CRAMP (análogo murino de la catelicidina humana) incrementó su producción de forma considerable en la etapa temprana, particularmente en el día 1 post infección (PI), donde se demostró por inmunohistoquímica (IHQ) la gran expresión por parte de EC's y MØ's. El segundo pico de producción se observó en el día 21 PI, cuando existe la máxima actividad protectora mediada por células tipo Th1. Al día 60 PI se observó carga bacteriana incrementada, extensa neumonía y disminución de la expresión de este péptido. Durante la enfermedad latente, la catelicidina murina se mantiene incrementada, pero baja en comparación con el modelo de TB progresiva.

Ésta producción rápida de AMP's se pudiera relacionar con la observación de que la infección primaria por TB raramente lleva a la enfermedad activa. Quizá la CRAMP y las β defensinas pueden contribuir a el mantenimiento de la infección latente de forma sinérgica.

Los adenovirus han sido utilizados como vectores de transferencia que contienen y expresan genes con propósitos terapéuticos. Los adenovirus que fueron utilizados son clasificados como de primera generación, cuya manipulación genética eliminó las regiones tempranas E1 y E3, esenciales para la replicación y codificación de proteínas involucradas con la evasión de la respuesta inmune. En el espacio deletado puede acomodarse un transgén, que se introduce por ligación enzimática o por recombinación homóloga. La generación y propagación de partículas víricas con genoma deficiente en E1 y E3 se lleva a cabo mediante transfección en líneas celulares que han incorporado establemente las regiones virales indispensables deletadas (células 293 o células 911). En estas células se completa el ciclo lítico y en el medio de cultivo se recogen los adenovirus recombinantes.

Los adenovirus presentan varias ventajas como vectores de transfección:

- Son muy eficientes para infectar células in vitro e in vivo.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- Infechan con igual eficiencia células quiescentes o replicativas.
- Tienen un amplio tropismo y capacidad para infectar un extenso espectro de células eucariotas procedentes de distinto tejido o especie, principalmente tejido respiratorio.
- La expresión del transgén es transitoria. No son capaces de replicarse, lo que los hace seguros.
- No se integran al genoma por lo que se evita el riesgo de mutaciones por inserción.
- Son producidos eficientemente en altos títulos (mayor a 10^{11} pfu).

Adicionalmente, tienen un gran tropismo por el epitelio respiratorio, favoreciendo su uso en nuestro modelo. Una vez que son captados por las células blanco, los adenovirus son eliminados del organismo después de algunos días, por lo que la expresión de la citocina es transitoria.

La terapia génica en los modelos de TB pulmonar experimental surgen como una herramienta terapéutica prometedora. La sobreexpresión de citocinas protectoras claves en la infección con TB se propone como una terapia adyuvante en el control y prevención de la enfermedad. La administración única de adenovirus recombinantes que sobreexpresan Interferón- γ (AdIFN γ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (AdGMCSF) han demostrado lo previamente mencionado. Bajo el conocimiento de que IFN- γ tiene un importante papel como citocina protectora en la fase inicial de la TB pulmonar, la administración de AdIFN γ en la fase crónica de la enfermedad generó una disminución significativa de la carga bacteriana y de el área neumónica con respecto al adenovirus vacío. Éste mismo tratamiento contribuyó para la organización y formación de granulomas de mayor tamaño y cantidad. Tras la administración conjunta de AdIFN γ con quimioterapia convencional, los resultados obtenidos tuvieron mayor contundencia: menor carga bacteriana y menor neumonía con respecto al tratamiento solo con adenovirus. Resultados similares fueron obtenidos al utilizar un modelo de TB progresiva con un aislado clínico resistente a primera línea de antibióticos (MDR). Con una estrategia experimental similar, se utilizó un adenovirus recombinante que sobreexpresa el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Ésta es una citocina pleoyotrópica con capacidad reguladora de la respuesta inflamatoria induciendo la diferenciación y activación de DC's. Como se ha reportado previamente, en modelos de TB experimental existe un retraso en el reclutamiento y maduración de DC's, contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune por parte de Mtb (23). Los resultados observados reflejaron una inmunidad protectora incrementada con activación rápida de DC's, incremento en la producción de IFN- γ , TNF- α y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), permitiendo el control eficiente del crecimiento bacteriano y de el daño histológico por neumonía, con generación de mayor número de granulomas y de mayor tamaño con respecto al adenovirus vacío. El mismo tratamiento fue efectivo en la prevención de la reactivación de la infección crónica murina similar a la TB latente y en la transmisión (24). De acuerdo a lo anterior, se puede evidenciar que el producto terapéutico (GM-CSF ó IFN- γ) de los adenovirus tiene un impacto importante en la resolución de la enfermedad.

En este proyecto se utilizarán 2 adenovirus que expresan β -defensina humana 3 y catelicidina (AdBdef y AdLL37) respectivamente. Esto es basado en la actividad antimicrobiana e inmunomoduladora que han demostrado ambos péptidos, por lo que se espera una disminución de carga bacteriana y lesión



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

pulmonar en ratones tratados. El adenovirus control (vacío) se denomina AdGFP. AdBdef, AdLL37 y AdGFP fueron construidos con la misma metodología que los antes mencionados, por lo que tienen un comportamiento similar. Nuestro modelo emplea dosis de adenovirus similares a las empleadas en los experimentos antes mencionados. Adicionalmente, se han realizado experimentos para evaluar el efecto histológico de 3 diferentes dosis de adenovirus (alta, media y baja) encontrándose únicamente infiltrados inflamatorios peribronquiales leves en días tempranos, resolviéndose a los 7 días sin evidenciar daño histológico en ninguna de las 3 dosis. Se decide utilizar una dosis de 5.47×10^7 pfu/ml (media) de acuerdo a la eficacia en la producción del péptido y menor daño histológico.

Estrategia Experimental.

Se utilizarán ratones machos de la cepa BALB/C de 8 semanas de edad y 22 gr de peso proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Los animales serán anestesiados con vapor de sevoflurano (100 μ L por ratón dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm) para su inoculación intratraqueal con 250,000 UFC de la cepa prototipo H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, extraídas en fase logarítmica a una densidad óptica de 0.400 a longitud de onda de 600 nm. Se corroborará pureza con tinción de Ziehl-Neelsen, y se suspenderán en un volumen de 100 μ L de buffer de fosfatos salino (PBS). Para la inoculación intratraqueal los animales se colocaran sobre una placa de unícel revestida con aluminio y se les sujetarán los incisivos con una liga de caucho, se introducirá una cánula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea.

A los dos meses postinfección cuando la enfermedad este en fase avanzada se administrara 1 dosis de Ad-H β D3/LL-37/AdGFP por vía IT utilizando el mismo procedimiento para la infección descrito previamente y se evaluará el efecto terapéutico e inmunomodulador durante los días 7, 15, 30, 60 y 120 postratamiento. Así mismo se contará con un grupo de ratones a los cuales no se administra el vector adenoviral (grupo PBS).

Por cada día de sacrificio se tomarán 12 ratones por grupo. Se evaluará la cantidad de bacterias vivas por determinación de unidades formadoras de colonia (UFC), daño histopatológico (Morfometría automatizada) y cuantificación de expresión de citocinas por qRT-PCR. Se realizará una variante del modelo de *TB progresiva* previo con infección de un aislado clínico resistente a la primer línea de antibióticos (MDR) con 75,000 bacterias. A los dos meses postinfección cuando la enfermedad este en fase avanzada se administrara 1 dosis de Ad-H β D3/LL-37/AdGFP por vía IT y se evaluará el efecto terapéutico durante la en los días 7, 15, 30, 60 y 120 postratamiento.

De la misma forma se evaluará el efecto adyuvante de la quimioterapia convencional antifímica tras la administración de los adenovirus terapéuticos, siguiendo el mismo modelo de enfermedad progresiva. Las dosis de antibióticos que se utilizarán son: Rifampicina (10 mg/kg), Isoniazida (10 mg/kg), Pirazinamida (30 mg/kg). Los antibióticos serán administrados en una solución única de lunes a viernes



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

en un volumen de 100ul por ratón vía intragástrica por medio de la cánula (ya mencionada anteriormente para el procedimiento de infección), siendo los ratones sujetados de la cola y la parte superior de la cabeza para exponer la boca y colocar el esófago lo más recto posible. La cinética de sacrificio es la misma que en los modelos antes mencionados.

En el modelo de latencia se evaluará, en grupos de 20 ratones, el efecto preventivo de la reactivación por la administración de los adenovirus recombinantes. Se utilizarán dosis bajas de Mtb H37Rv (4000 bacterias) para infectar ratones B6D2F1 por vía IT, con lo cual se induce tuberculosis crónica muy similar a TBL, después de 5-7 meses se administrarán vía IT 1 dosis de Ad-H β D3/LL-37/AdGFP. Después de un mes se administrará cortisona en el agua de bebida a una dosis de 3 mg/L, logrando concentraciones suprafisiológicas e induciendo la reactivación de la enfermedad. La prevención de la misma se evaluará por determinación de UFC y morfometría. Se sacrificarán los ratones un mes posterior a la administración de cortisona en un solo evento.

La contribución de esta forma de terapia génica en la *prevención de la transmisión* se evaluará en un modelo de convivencia entre ratones sanos e infectados vía IT con una dosis alta (250 000 bacterias cepa 5186) para inducir TB progresiva. 20 ratones sanos y 20 ratones infectados conviven por dos meses en el mismo microaislador (grupos de 5 infectados con 5 no infectados). Un grupo de ratones no infectados se le administrará el adenovirus por vía IT un día antes de convivir con los infectados. Después de 1 y 2 meses se sacrificarán como se describió previamente para evaluar carga bacilar por UFC, daño histológico y con prueba de hipersensibilidad cutánea. Esta prueba consiste en la comparación del cambio de grosor del cojinete plantar de los ratones convivientes, por lo que se realizará una medición inicial del cojinete plantar derecho de ratones sanos. Se administrarán 40ul de un derivado protéico purificado (PPD) rico en antígenos de Mtb (concentración 1.4mg/ml) en el cojinete plantar derecho. Una vez transcurrido los 30 días de convivencia se realizará una medición comparativa con la inicial. Esta medición reflejará la respuesta celular inducida por antígenos micobacterianos expresado como un incremento del porcentaje de cojinete plantar. Esta prueba se realiza dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III.

Sacrificio, obtención y destino de muestras

Grupos de 12 o 20 ratones de cada experimento/grupo serán anestesiados con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal a una dosis de 210mg/kg y sacrificados por exanguinación a los días 7, 15, 30, 60 y 120 de la infección por adenovirus. De cada individuo se obtendrán por disección ambos pulmones y bazo, los pulmones de tres individuos por grupo serán perfundidos vía intratraqueal con alcohol absoluto para obtener una adecuada expansión alveolar y se conservarán en alcohol absoluto para su posterior análisis histológico. Así mismo, los pulmones, bazos y sueros de 9 ratones de cada grupo, se congelarán inmediatamente en nitrógeno líquido postdisección y serán guardados a -70 grados centígrados hasta su procesamiento. 6 serán ratones serán utilizados para determinación de carga bacilar y 3 para extracción de ácidos nucleicos. Se evaluará la cantidad de bacterias vivas por determinación de unidades formadoras de colonia (UFC) en medio de crecimiento sólido 7H10,



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

medición del porcentaje de daño neumónico por morfometría automatizada y cuantificación de la expresión de citocinas por q-PCR. En el caso de los modelos que empleamos 20 ratones por día de sacrificio se utilizarán 10 ratones para determinación de carga bacteriana, 5 para análisis histológico y 5 para técnicas de biología molecular.

Manejo de desechos y medidas de bioseguridad.

Los animales utilizados para los estudios son alojados en cajas ventiladas bajo presión negativa y aire suministrado a través de filtros HEPA y manipulados bajo Bioseguridad Animal Nivel 2 [2].

Los procedimientos de generación y utilización de adenovirus se realizarán dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad III. Al final de cada procedimiento, las superficies de trabajo, todo el material y los desechos serán inactivados con Clidox™ 1:1:18 partes de agua/15min (este desinfectante es mas efectivo que el cloro y no daña el acero inoxidable). Así mismo, las superficies de trabajo se limpian con cloro al 10% por 10 minutos dentro del gabinete de bioseguridad. Una vez inactivado, el material de desecho se saca del gabinete de bioseguridad y se coloca en bolsa roja resistente al proceso de esterilización (121°C/21lbs/20min) marcada con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO INFECCIOSOS".

Para el transporte de agentes patógenos (adenovirus o micobacterias) del laboratorio de patología experimental a las instalaciones en el DIEB, los viales se colocan rodeados de material absorbente y dentro de una bolsa de cierre hermético. Posteriormente, rodeado de refrigerantes, se coloca dentro de un contenedor plástico diseñado para llevar muestras biológicas de forma segura para todos los modos de transporte (Bio-Bottle, tapa anaranjada de altura 23cm por 12cm de diámetro, con capacidad de 2.5L) etiquetado con el símbolo de sustancia infecciosa y el nombre del patógeno.

Todos los procedimientos en donde se utilicen micobacterias, se realizarán dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad III en las instalaciones de patología experimental en el DIEB del INCMNSZ. El material de cama que esta en contacto con los ratones infectados con micobacterias y tratados con adenovirus se manejará dentro de gabinetes de flujo laminar con nivel de bioseguridad III, el aserrín se depositará en bolsa roja resistente al proceso de esterilización (121°C/21lbs/20min), marcada con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO INFECCIOSOS", de igual manera los cadáveres de los ratones, se colocarán en otra bolsa de iguales características, etiquetada con la fecha y número de ratones, para el mismo proceso de esterilización. Una vez completado el ciclo de esterilización la bolsa roja que contiene los cadáveres se colocará dentro de una bolsa de plástico amarilla marcada con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO INFECCIOSOS", la cual será trasladada al depósito temporal de RPBI del instituto.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B:	C:	D: XX	E:
------------	----	----	----	-------	----

- 5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información el Investigador deberá consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

De acuerdo a la metodología descrita en el protocolo en extenso, se calcularon un total de 12 ratones por día de sacrificio. Esto tomando en cuenta que: 6 ratones se destinarán para llevar a cabo la cuantificación de la carga bacilar, 3 ratones para el estudio histológico y 3 más para realizar técnicas de biología molecular (q-PCR). Desafortunadamente, debido a la metodología que cada técnica requiere, no es posible compartir las muestras. Las muestras destinadas para la cuantificación de carga bacteriana son homogenizadas con PBS tween, imposibilitando su uso para extracción de ácidos nucleicos. De la misma forma, aquellos pulmones perfundidos con etanol no pueden ser utilizados para llevar a cabo otras técnicas. Por lo tanto, este es el número mínimo de animales que se requiere no solo para obtener las muestras necesarias y poder obtener una diferencia estadísticamente significativa, así mismo, es el mínimo requerido para poder publicar los resultados. Se solicita un 10% adicional de animales para el caso de las pérdidas durante el experimento. También consideramos los ratones necesarios para llevar a cabo una repetición en un periodo no mayor a 2 años.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

6) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario.

NO APLICA

7) Mencione el número y las especies animales, así como el genero que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Raño de peso	Rango de edad	Sexo
<i>Mus musculus</i> (BALB/c)	1880	21-22 g	49-56 semanas	Machos
No. de Grupos experimentales:		20 grupos experimentales 1ª etapa: 7 grupos (420 ratones) 2ª etapa: 4 grupos (240 ratones) 3ª etapa: 9 grupos (280 ratones)		
No. de animales por grupo:		12 ratones (TB progresiva) 20 ratones (TB latente y transmisibilidad)		
No. TOTAL DE ANIMALES:		940 ratones 1880 considerando repetición		
		Los modelos de TB progresiva con la cepa H37Rv pueden ser manejados de forma simultánea, por lo que de primera instancia se requieren 420 ratones. Posteriormente se requerirá un grupo de ratones para la cepa MDR (240 ratones) y finalmente los ratones correspondientes a los modelos de TB latente y de transmisibilidad (280). Una vez concluidos los experimentos, se llevará a cabo la repetición de los mismos.		

MODELO	INFECCIÓN: CEPA Y No. DE BACTERIAS	GRUPOS	CINÉTICA DE SACRIFICIO (DÍAS POSTRATAMIENTO)	No. DE RATONES SACRIFICADOS POR GRUPO	No. RATONES TOTALES	FECHA DE ENTREGA DE RATONES
--------	---	--------	---	---	------------------------	-----------------------------------



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

TB PROGRESIVA	H37RV 250 000 bacterias	- Ad-H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - PBS (4 GRUPOS)	7, 15, 30, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	240	Marzo 2016
TB PROGRESIVA (tratamiento con antibióticos)	H37RV 250 000 bacterias	- Ad-H β D3 + Antibiótico - AdLL-37 + Antibiótico - Antibiótico solo (3 GRUPOS)	7, 15, 30, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	180	
TB PROGRESIVA (cepa MDR)	MDR 75 000 bacterias	- Ad-H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - PBS (4 GRUPOS)	7, 15, 30, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	240	Septiembre 2016
TB LATENTE	H37Rv 4000 bacterias	- Ad-H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - PBS (4 GRUPOS)	60 (1 SACRIFICIO)	20	80	
TRANSMISIBILIDAD	5186 250 000 bacterias	- Ad-H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - INH - PBS (5 GRUPOS)	30 Y 60 (2 SACRIFICIOS)	20 (10 RATONES INFECTADOS Y 10 RATONES NO- INFECTADOS)	200	Diciembre 2016
GRAN TOTAL					940 RATONES (1880 considerando repetición)	Consideramos una repetición con la misma cantidad de ratones en un periodo no mayor a 2 años.

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.
Aproximadamente 4 meses

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	X		
Toma de muestras biológicas.		X	Al momento del sacrificio
Colocación de cánulas y sondas.		X	2 veces intratraqueal (Infección por <i>M. tuberculosis</i> y Adenovirus recombinantes)
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.		X	1 vez. <i>M. tuberculosis</i> intratraqueal 1 vez Adenovirus recombinantes
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.		X	Al momento del sacrificio



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Uso de adyuvantes (indicar cuáles)	X		
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento	X		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

INFECCION

Para infectar a los ratones se utilizara una cánula de calibre 22Gx1", el ratón es anestesiado con Sevoflurano (100uL por ratón dentro de una cámara de 20x20x20cm, no es recomendable utilizar Ketamina debido a que es un inductor de la producción de interleucinas de tipo antiinflamatorio lo que intervendría directamente en el desarrollo de nuestro experimento), una vez anestesiado se sujetara sobre una placa de aluminio utilizando una liga de caucho sobre los incisivos del animal, se localizara la tráquea apoyándose con el tacto y la cánula, una vez localizada se inyectaran 250,000 UFC de *M. tuberculosis*/100ul de SSI, este procedimiento solo se realizara una vez al inicio del experimento y se hará bajo condiciones de bioseguridad nivel III.

Para la administración de los vectores adenovirales se seguirá la misma técnica descrita para la administración intratraqueal de *M.tuberculosis*.

EUTANASIA

Los animales serán inyectados con Pentobarbital 210 mg/kg IP. Se expondra la cavidad peritoneal y torácica para recolectar, el bazo y los pulmones, las muestras se colocaran dentro de criotubos de 2 ml.

11) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Anestésico	Sevofluroano	100uL	Inhalada	Dosis única
Anestésico	Pentobarbital	210mg/kg	Intraperitoneal	Dosis única



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

12) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?
Relajación muscular, pérdida del reflejo ocular

13) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

NO APLICA

14) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal			X	
b) Apariencia			X	
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)				X
d) Conducta espontánea.	X			
e) Conducta provocada.			X	

15) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

Caquexia
Taqipnea.
Adinamia.
Piloerección.
Postura encorvada.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
 2. Moderada del 10-20%
 3. Substantial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 1. 0 si es normal.
 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 3. 2 si está afectado
 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care

http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

- 16) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?
Pentobarbital 210mg/kg IP*

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.

Especie	Método	Dosis	Via
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

- 17) El protocolo representa riesgo biológico?

- a) No b) **Si (Biodesgruidad Nivel 3)**

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5_sect_V.pdf

18) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?

Los cadáveres y todos los desechos generados en la manutención de los ratones serán colocados dentro de una bolsa de plástico de color rojo resistente a un ciclo de esterilización por vapor (121°C/20lb/in²/30 min), una vez terminado el ciclo la bolsa se colocara dentro de una bolsa de plástico de color amarillo, impermeable con la leyenda "PELIGRO, RESIDUOS BIOLOGICO-INFECIOSOS". Se trasladaran al depósito temporal del INCMNSZ.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
*Investigador en Ciencias Médicas F
Departamento de Patología
Sección de Patología Experimental*

Integrantes	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal Externo	
MVZ. Mariela Contreras Escamilla	Vocal	
Dra. Gabriela Alemán Escondrillas	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dr. José Carlos Crispín Acuña	Vocal	



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA: 1580

FOLIO DE REGISTRO: PAT-1580-15/17-1

Fecha de registro del Protocolo: 8 DE FEBRERO 2016

Título del Protocolo: "Efecto inmunoterapéutico e inmunomodulador de la Beta defensina humana-3 (H β D-3) y la catelicidina (LL-37) en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva, latencia y transmisibilidad en ratones BALB/c y B6D2F1"

Propuesta: a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Patología, Sección de Patología Experimental
Teléfono	54870900 ext. 2185, 2194 y 7126
Correo electrónico	○

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Dra. Dulce A. Mata Espinosa	INCMNSZ, Depto. de Patología, Sección de Patología Experimental	Doctor	54870900 ext. 2185 y 2194	○
Dra. Brenda N. Marquina Castillo	INCMNSZ, Depto. de Patología, Sección de Patología Experimental	Doctor	54870900 ext. 2185 y 2194	○
Dr. Jorge A. Barrios Payán	INCMNSZ, Depto. de Patología, Sección de Patología Experimental	Doctor	54870900 ext. 2185 y 2194	○

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
○	INCMNSZ, Depto. de Patología Sección de Patología Experimental	Doctorado	5548609611	○

Vigencia del Protocolo.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

	Mes	Año
Fecha estimada de inicio del protocolo	Agosto	2016
Fecha tentativa de finalización.	Agosto	2017

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

1) Institución en donde se realizará el proyecto:

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran". Departamento de Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental

2) Objetivos Generales y específicos del protocolo:

Evaluar la H β D-3 y LL-37 en su efecto inmuñomodulador e inmunoterapéutico en la TB pulmonar murina:

- Evaluar el efecto inmunoterapéutico e inmunomodulador de la sobreexpresión de la β -defensina y la Catelicidina en la fase progresiva de la tuberculosis pulmonar murina
- Evaluar la sobreexpresión de la β -defensina y la Catelicidina en la prevención de la reactivación de la infección crónica murina similar a la tuberculosis latente.
- Evaluar la sobreexpresión de la β -defensina y la Catelicidina en la prevención a corto plazo de la transmisión de *M. tuberculosis* en convivientes sanos
- Evaluar el efecto inmunoterapéutico de la sobreexpresión de H β D-3 y LL-37 en sinergia con tratamiento convencional con Isoniazida, Rifampicina y Pirazinamida en la fase progresiva del modelo murino de TB pulmonar
- Evaluar el efecto inmunoterapéutico de la sobreexpresión de H β D-3 y LL37 en la fase progresiva del modelo murino de TB pulmonar con una cepa multidrogoresistente (MDR)

3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

El tratamiento para la TB es por periodos prolongados (6-18 meses) con diversos antibióticos, presentando con frecuencia efectos colaterales importantes, condicionando abandono terapéutico, recaídas y aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR-TB) y extremadamente resistentes (XDR-TB) que complica el control de la enfermedad, por ello es necesario buscar nuevas alternativas que sean cortas, inocuas, efectivas. La terapia génica basada en adenovirus recombinantes que sobreexpresan péptidos protectores es potencialmente una herramienta terapéutica para el control de la enfermedad.

Los adenovirus han sido utilizados como vectores de transferencia que contienen y expresan genes con propósitos terapéuticos. Los adenovirus que fueron utilizados son clasificados como de primera generación, cuya manipulación genética eliminó las regiones tempranas E1 y E3, esenciales para la replicación y codificación de proteínas involucradas con la evasión de la respuesta inmune. En el espacio deletado puede acomodarse un transgén, que se introduce por ligación enzimática o por recombinación homóloga. La generación y propagación de partículas víricas con genoma deficiente en E1 y E3 se lleva a cabo mediante transfección en líneas celulares que han incorporado establemente las regiones virales indispensables deletadas (células 293 o células 911). En estas células se completa el ciclo lítico y en el medio de cultivo se recogen los adenovirus recombinantes.

Los adenovirus presentan varias ventajas como vectores de transfección:

- Son muy eficientes para infectar células in vitro e in vivo.
- Infectan con igual eficiencia células quiescentes o replicativas.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- Tienen un amplio tropismo y capacidad para infectar un extenso espectro de células eucariotas procedentes de distinto tejido o especie, principalmente tejido respiratorio
- La expresión del transgén es transitoria y no son capaces de replicarse, lo que los hace seguros para su uso.
- No se integran al genoma por lo que se evita el riesgo de mutaciones por inserción, por lo cual son inocuos.
- Son producidos eficientemente en altos títulos (mayor a 10^{11} pfu).

Los adenovirus recombinantes tienen un gran tropismo por el epitelio respiratorio, favoreciendo su uso en nuestro modelo. Una vez que son captados por las células blanco, los adenovirus son eliminados del organismo después de algunos días, por lo que la expresión de la citocina es transitoria.

La terapia génica en los modelos de TB pulmonar experimental surgen como una herramienta terapéutica prometedora. La sobreexpresión de citocinas protectoras claves en la infección con TB se propone como una terapia adyuvante en el control y prevención de la enfermedad. La administración única de adenovirus recombinantes que sobreexpresan Interferón- γ (AdIFN γ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (AdGMCSF) han demostrado lo previamente mencionado.

Bajo el conocimiento de que IFN- γ tiene un importante papel como citocina protectora en la fase inicial de la TB pulmonar, la administración de AdIFN γ en la fase crónica de la enfermedad generó una disminución significativa de la carga bacteriana y de el área neumónica con respecto al adenovirus vacío. Éste mismo tratamiento contribuyó para la organización y formación de granulomas de mayor tamaño y cantidad. Tras la administración conjunta de AdIFN γ con quimioterapia convencional, los resultados obtenidos tuvieron mayor contundencia. menor carga bacteriana y menor neumonía con respecto al tratamiento mayor con adenovirus. Resultados similares fueron obtenidos al utilizar un modelo de TB progresiva con un aislado clínico resistente a primera línea de antibióticos (MDR).

Con una estrategia experimental similar, se utilizó un adenovirus recombinante que sobreexpresa el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Ésta es una citocina pleiotrópica con capacidad reguladora de la respuesta inflamatoria induciendo la diferenciación y activación de DC's. Como se ha reportado previamente, en modelos de TB experimental existe un retraso en el reclutamiento y maduración de DC's, contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune por parte de Mtb (23). Los resultados observados reflejaron una inmunidad protectora incrementada con activación rápida de DC's, incremento en la producción de IFN- γ , TNF- α y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), permitiendo el control eficiente del crecimiento bacteriano y de el daño histológico por neumonía, con generación de mayor número de granulomas y de mayor tamaño con respecto al adenovirus vacío. El mismo tratamiento fue efectivo en la prevención de la reactivación de la infección crónica murina similar a la TB latente y en la transmisión (24). De acuerdo a lo anterior, se puede evidenciar que el producto terapéutico (GM-CSF ó IFN- γ) de los adenovirus tiene un impacto importante en la resolución de la enfermedad.

En este proyecto se utilizarán 2 adenovirus que expresan β -defensina humana 3 y catelicidina (AdBdef y AdLL37) respectivamente. Esto es basado en la actividad antimicrobiana e inmunomoduladora que han demostrado ambos péptidos, por lo que se espera una disminución de carga bacteriana y lesión pulmonar en ratones tratados. El adenovirus control (vacío) se denomina AdGFP. AdBdef, AdLL37 y AdGFP fueron construidos con la misma metodología que los antes mencionados, por lo que tienen un comportamiento similar. Nuestro modelo emplea dosis de adenovirus similares a las empleadas en los experimentos antes mencionados. Adicionalmente, se han realizado experimentos para evaluar el efecto histológico de 3 diferentes dosis de adenovirus (alta, media y baja) encontrándose únicamente infiltrados inflamatorios peribronquiales leves en días tempranos, resolviéndose a los 7 días sin evidenciar daño histológico en ninguna de las 3 dosis. Se decide utilizar una dosis de 5.47×10^7 pfu/ml (media) de acuerdo a la eficacia en la producción del péptido y menor daño histológico.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Procedimiento:

Se utilizarán ratones machos de la cepa BALB/C de 8 semanas de edad y 22 gr de peso proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ). Los animales serán anestesiados con vapor de sevoflurano (100 μ L por ratón dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm) para su inoculación intratraqueal con 250,000 UFC de la cepa prototipo H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, extraídas en fase logarítmica a una densidad óptica de 0.400 a longitud de onda de 600 nm. Se corroborará pureza con tinción de Ziehl-Neelsen, y se suspenderán en un volumen de 100 μ l de buffer de fosfatos salino (PBS).

Para la inoculación intratraqueal los animales se colocaran sobre una placa de unicel revestida con aluminio y se les sujetarán los incisivos con una liga de caucho, se introducirá una cánula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea.

A los dos meses postinfección cuando la enfermedad este en fase avanzada se administrara 1 dosis de Ad-H β D3/LL-37/AdGFP por vía IT utilizando el mismo procedimiento para la infección descrito previamente y se evaluará el efecto terapéutico e inmunomodulador durante los días 7, 15, 30, 60 y 120 postratamiento. Así mismo se contará con un grupo de ratones a los cuales no se administra el vector adenoviral (grupo PBS). Por cada día de sacrificio se tomarán 6 ratones por grupo. Se evaluará la cantidad de bacterias vivas por determinación de unidades formadoras de colonia (UFC), daño histopatológico (Morfometría automatizada) y respuesta inmunológica (expresión de citocinas por qRT-PCR y Citometría de Flujo).

Se realizará una variante del modelo de TB progresiva previo con infección de un aislado clínico resistente a la primer línea de antibióticos (MDR) con 75,000 bacterias. A los dos meses postinfección cuando la enfermedad este en fase avanzada se administrara 1 dosis de Ad-H β D3/LL-37/AdGFP por vía IT y se evaluará el efecto terapéutico e inmunomodulador durante la en los días 7, 15, 30, 60 y 120 postratamiento.

De la misma forma se evaluará el efecto adyuvante de la quimioterapia convencional tras la administración de los adenovirus terapéuticos, siguiendo el mismo modelo de enfermedad progresiva. Las dosis de antibióticos que se utilizarán son: Rifampicina (10 mg/kg), Isoniazida (10 mg/kg), Pirazinamida (30 mg/kg).

Los antibióticos serán administrados en una solución única de lunes a viernes en un volumen de 100ul por ratón vía intragástrica por medio de la cánula ya mencionada anteriormente para el procedimiento de infección, siendo los ratones sujetados de la cola y la parte superior de la cabeza para exponer la boca y colocar el esófago lo más recto posible. El procedimiento se llevará a cabo dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III en las instalaciones de patología experimental en el bioterio del INCMNSZ.

Grupos de 12 ratones de cada grupo serán anestesiados con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal a una dosis de 210mg/kg y sacrificados por exanguinación a los días 7, 14, 30, 60 y 120 de la infección por adenovirus. De cada individuo se obtendrán por disección ambos pulmones y bazo, los pulmones de tres individuos por grupo serán perfundidos intratraquealmente con alcohol absoluto para obtener una adecuada expansión alveolar y se conservaran en alcohol absoluto junto con 3 bazos para su posterior análisis histológico. Así mismo, los pulmones de 6 individuos, 6 bazos y los sueros de los ratones de cada grupo, se congelarán inmediatamente en nitrógeno líquido postdisección y serán guardados a -70 grados centígrados hasta su procesamiento, 3 serán utilizados para determinación de carga bacilar por conteo de UFC y los otros 3 para extracción de ácidos nucleicos. Todos los procedimientos se realizaran dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III.

Se evaluará la cantidad de bacterias vivas por determinación de unidades formadoras de colonia (UFC), daño histopatológico (Morfometría automatizada) y respuesta inmunológica (expresión de citocinas por qRT-PCR y Citometría de Flujo).

En el modelo de latencia se evaluará, en grupos de 20 ratones, el efecto preventivo de la



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

reactivación por la administración de los adenovirus recombinantes. Se utilizarán dosis bajas de Mtb H37Rv (4000 bacterias) para infectar ratones B6D2F1 por vía IT, con lo cual se induce tuberculosis crónica muy similar a TBL; después de 5 meses se administrarán vía IT 1 dosis de Ad-H β D3/LL-37/AdGFP. Después de un mes se administrará cortisona en el agua de bebida a una dosis de 3 mg/L para inducir reactivación de la enfermedad. La prevención de la misma se evaluará por determinación de UFC y morfometría.

La contribución de esta forma de terapia génica en la prevención de la transmisión se evaluará en un modelo de convivencia entre ratones sanos e infectados vía IT con una dosis alta (250 000 bacterias cepa 5186) para inducir TB progresiva, 20 ratones sanos y 20 ratones infectados conviven por dos meses en el mismo microaislador (grupos de 5 infectados con 5 no infectados). Un grupo de ratones no infectados se le administrará el adenovirus por vía IT un día antes de convivir con los infectados. Después de 1 y 2 meses se sacrificarán como se describió previamente para evaluar carga bacilar por UFC, daño histológico y con prueba de hipersensibilidad cutánea. Esta prueba consiste en la comparación del cambio de grosor del cojinete plantar de los ratones convivientes, por lo que se realizará una medición inicial del cojinete plantar derecho de ratones sanos. Se administrarán 40ul de un derivado proteico purificado (PPD) rico en antígenos de Mtb (concentración 1.4mg/ml) en el cojinete plantar derecho. Una vez transcurrido los 30 días de convivencia se realizará una medición comparativa con la inicial. Esta prueba se realiza dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III. Se evaluará la inmunoreactividad en contra de antígenos micobacterianos expresado en cambio de porcentaje de grosor de cojinete plantar.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B:	C:	D: XX	E:
------------	----	----	----	-------	----

- 5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información el Investigador deberá consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Para la determinación de la carga bacilar, el análisis histológico, Citometría de Flujo y los estudios por biología molecular utilizaremos 12 animales por tiempo de sacrificio. Este es el número mínimo de animales que se requiere no solo para obtener las muestras necesarias y poder obtener una diferencia estadísticamente significativa. También es el mínimo requerido para poder publicar los resultados. Además se solicita un 10% mas de animales para el caso de las pérdidas durante el experimento.

- 6) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario.

NO APLICA

- 7) Mencione el número y las especies animales, así como el genero que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratón		21-22 g	49-56 semanas	Machos
No. de Grupos experimentales:		20 grupos experimentales		
No. de animales por grupo:		12		
No. TOTAL DE ANIMALES:		1880		

MODELO	INFECCIÓN: CEPA Y No. DE BACTERIAS	GRUPOS	CINÉTICA DE SACRIFICIO (DÍAS POSTRATAMIENTO)	No. DE RATONES SACRIFICADOS POR GRUPO	No. RATONES TOTALES	FECHA DE ENTREGA DE RATONES
TB PROGRESIVA	H37RV 250.000 bacterias	- Ad- H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - PBS (4 GRUPOS)	7, 15, 30, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	240	Marzo 2010



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

TB PROGRESIVA (tratamiento con antibióticos)	H37RV 250 000 bacterias	- Ad- H β D3 + Antibiótico - AdLL-37 + Antibiótico - Antibiótico solo (3 GRUPOS)	7, 15, 30, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	180	
TB PROGRESIVA (cepa MDR)	MDR 75 000 bacterias	- Ad- H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - PBS (4 GRUPOS)	7, 15, 30, 60 Y 120 (5 SACRIFICIOS)	12	240	Septiembre 2016
TB LATENTE	H37Rv 4000 bacterias	- Ad- H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - PBS (4 GRUPOS)	60 (1 SACRIFICIO)	20	80	
TRANSMISIBILIDAD	5186 250 000 bacterias	- Ad- H β D3 - AdLL-37 - AdGFP - INH - PBS (5 GRUPOS)	30 Y 60 (2 SACRIFICIOS)	20 (10 RATONES INFECTADOS Y 10 RATONES NO- INFECTADOS)	200	Diciembre 2016
					GRAN TOTAL 940 RATONES	Consideram una repetic con la mism cantidad de ratones en t periodo no mayor a 2 años.

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	x		



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

Toma de muestras biológicas.		x	Al momento del sacrificio
Colocación de cánulas y sondas.		x	
Técnica para observación y modificación de conducta.	x		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.		x	1 vez. M tuberculosis intratraqueal 1 vez Adenovirus recombinantes
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	x		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.		x	Al momento del sacrificio
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)	x		
Restricción física	x		
Confinamiento o aislamiento	x		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	x		
Inducción de lesiones	x		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	x		
Administración de sustancias químicas tóxicas	x		
Implantes o injertos	x		
Estudios estereotáxicos.	x		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

INFECCION

Para infectar a los ratones se utilizara una cánula de calibre 22Gx1", el ratón es anestesiado con Sevofluorano (100uL por ratón dentro de una cámara de 20x20x20cm, no es recomendable utilizar Ketamina debido a que es un inductor de la producción de interleucinas de tipo antiinflamatorio lo que intervendría directamente en el desarrollo de nuestro experimento), una vez anestesiado se sujetara sobre una placa de aluminio utilizando una liga de caucho sobre los incisivos del animal, se localizara la tráquea apoyándose con el tacto y la cánula, una vez localizada se inyectaran 250,000 UFC de *M. tuberculosis*/100ul de SSI, este procedimiento solo se realizara una vez al inicio del experimento y se hará bajo condiciones de bioseguridad nivel III.

EUTANASIA

Los animales serán inyectados con Pentobarbital 210 mg/kg IP. Se expondra la cavidad peritoneal y torácica para recolectar, el bazo y los pulmones, las muestras se colocaran dentro de criotubos de 2 ml.

11) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Anestésico Sevofluoroano	100uL inhalada	Una vez.		

--



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

12) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?
Relajación muscular, pérdida del reflejo ocular

13) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

NO APLICA

14) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal			X	
b) Apariencia			X	
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)				X
d) Conducta espontánea.	X			
e) Conducta provocada.			X	

15) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
 2. Moderada del 10-20%
 3. Substantial > al 20% (criterio de punto final).



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.**

b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:

1. 0 si es normal.
2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
3. 2 si está afectado
4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care

http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

16) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Pentobarbital 210mg/kg IP

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.

Especie	Método	Dosis	Via
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo* Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

17) El protocolo representa riesgo biológico?

a) No

b) Si

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.

http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5_sect_V.pdf



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

18) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?
Los cadáveres de los ratones después del sacrificio se colocan en una bolsa roja ya que es la única que soporta un proceso de esterilización en una autoclave, dicha bolsa se etiqueta con la fecha y número de ratones sacrificados. Terminando el proceso de esterilización los desechos de los cadáveres ya estériles se colocan en una bolsa amarilla y se colocan en el almacén de residuos biológicos infecciosos producidos por el instituto.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
Investigador en Ciencias Médicas F
Departamento de Patología
Sección de Patología Experimental

Integrantes de la CINVA.	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dr. Rafael Hernández González	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal Externo	



Sistema Integral



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

Folio del registro: PAT-1580-15/17-1

Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776

Formato Único de Registro

(0) Comentarios

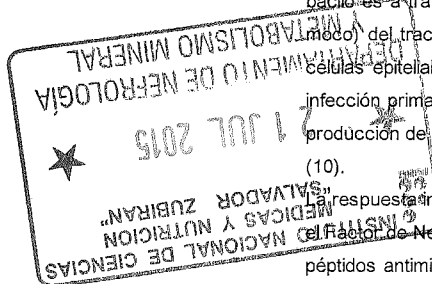
Título del proyecto: EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO E INMUNOMODULADOR DE LA BETA DEFENSINA HUMANA-3 (HBD-3) Y LA CATELICIDINA (LL-37) EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA

Tipo de proyecto: Investigación Experimental

Antecedentes: La tuberculosis (TB) es la segunda causa de mortalidad mundial causada por un solo agente infeccioso. En 2013, 9 millones de personas enfermaron y 1.5 millones murieron por ésta causa (1). En el mismo año, México reportó 18,986 casos de TB en todas sus formas, predominando la forma pulmonar de la enfermedad y reportándose un total de 2,414 defunciones. 152 casos nuevos de TB farmacorresistente (2).

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) puede producir enfermedad progresiva o infección latente (TBL). En las áreas endémicas la infección primaria sucede durante la niñez y solo el 5 al 10% evoluciona a enfermedad progresiva (3). A pesar de que la infección primaria usualmente es controlada satisfactoriamente por el sistema inmune, no todas las bacterias son eliminadas y algunas permanecen en los tejidos en un estado no-replicativo por el resto de la vida del individuo (4). Se calcula que un tercio de la humanidad tiene TBL y en los países no endémicos se estima que el 10% de los individuos con esta condición desarrollaran enfermedad activa por reactivación bacteriana (5). Los pacientes con TB pulmonar activa son la fuente mas importante de transmisión, el riesgo es determinado por el grado de enfermedad del caso índice y su interacción con convivientes (6). Particularmente, los niños cercanos a un familiar tuberculoso tienen riesgo muy alto de ser infectados y desarrollar enfermedad progresiva. Evitar este contacto es la mejor forma de prevenir el contagio. Otra estrategia es la administración de Isoniazida por un año (7), lo cual lleva a poco apego por parte del paciente, alto riesgo de reinfección y selección de cepas multidrogaresistentes (MDR) (8). La transmisión del bacilo es a través de gotas respiratorias que evaden los mecanismos de defensa de primera línea (movimiento ciliar, moco) del tracto respiratorio. Desde un punto de vista histopatológico, se considera que los macrófagos (MØ) y las células epiteliales (EC) son las primeras células de la respuesta inmune que entran en contacto con Mtb durante la infección primaria (9). Éstas células participan de forma adicional en el control de la infección bacteriana a través de la producción de péptidos con actividad antimicrobiana e inmunorreguladora como las β defensinas y la catelicidina (LL-37) (10).

La respuesta inmune innata ante la infección por Mtb se caracteriza por la secreción de citocinas pro-inflamatorias como el factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina 1(IL-1), los cuales son potentes inductores de la producción de péptidos antimicrobicos. De la inmunopatogenia de la tuberculosis experimental se han descrito dos fases: la primera comprendida entre los días 1 a 28 postinfección caracterizada por un predominio de citocinas proinflamatorias como interferón gamma (INF γ), IL-12, IL-2, TNF α entre otras, con un perfil de diferenciación CD4+ a Th1 y MØ con fenotipo M1, caracterizados por una elevada producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS, RNS), e incrementada capacidad fagocítica. Durante esta fase existe la formación de granulomas capaces de contener el



desarrollo bacilar. En una segunda etapa, la diferenciación linfocitaria es predominantemente de tipo Th2 y presencia de MØ con fenotipo M2 que se caracteriza por disminución de citocinas proinflamatorias e incremento de citocinas antiinflamatorias: IL-4, IL-10, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), entre otras. La capacidad fagocítica disminuye así como la producción de ROS y RNS, con sustitución de los granulomas por tejido fibrótico rico en colágeno tipo 1, y progresión de la enfermedad caracterizada por una elevada carga bacilar y muerte del individuo (11). Actualmente, el tratamiento para esta enfermedad implica la administración de múltiples medicamentos por periodos prolongados y con efectos secundarios importantes que condicionan el abandono terapéutico por parte del paciente. Existe una necesidad importante por el surgimiento de nuevas estrategias terapéuticas y profilácticas para el control de la TB. Por ello, se han propuesto nuevas herramientas utilizando vectores adenovirales para la expresión o sobreexpresión de genes terapéuticos con aplicación en TB. Uno de los candidatos más innovadores por sus características antimicrobianas e inmunomoduladoras son los péptidos antimicrobianos.

Los péptidos antimicrobianos (AMP's) son moléculas catiónicas características de la inmunidad innata con propiedades microbicidas e inmunorreguladoras que surgen como respuesta de primera línea ante agentes infecciosos. Los AMP's pueden diferir en tamaño, secuencia de aminoácidos y estructura; sin embargo, todos se encuentran genéticamente codificados; es decir, un gen codifica para cada péptido específico, independientemente de que éstos puedan tener alguna modificación postranscripcional. En humanos, se encuentran divididos en tres principales familias: defensinas, catelicidinas e histaninas. La mayoría de los péptidos antimicrobianos comparten dos características comunes: Primero, tienen carga neta positiva debido a la presencia de un gran número de aminoácidos catiónicos (en su mayoría lisina y arginina), y segundo, aproximadamente 50% de los aminoácidos que los constituyen son hidrofóbicos (14). Las defensinas son AMP's constitutivos o inducibles de 30 a 50 aminoácidos clasificadas en α , β y δ en base en la posición de los residuos de cisteína y número de enlaces disulfuro. Funcionalmente, las β defensinas tienen actividad antimicrobiana contra Gram(-) y Gram(+), hongos, parásitos y virus encapsulados. El mecanismo de lisis es a través de la disrupción de membranas y formación de poros. Estos péptidos también cuentan con una importante actividad quimiotáctica sobre células del sistema inmune y activación de DC inmaduras (12,13). La catelicidina (LL37), única en su familia, cuenta con mecanismos de acción similares, además de tener la capacidad de unirse directamente sobre ácidos nucleicos, específicamente a grupos fosfato por uniones electrostáticas. También se han descrito propiedades quimiotácticas y angiogénicas (14).

En el modelo experimental de TB progresiva con ratones BALB/c se ha demostrado una alta expresión de β defensina 2 murina (m β D-2), principalmente a los 14 días de infección, seguido por un descenso gradual en los días 21 y 28. La mayor expresión de este péptido coincide con la formación de granulomas y una máxima producción de citocinas de tipo Th1, mientras que durante la fase avanzada estas dejan de producirse en coexistencia con mayor crecimiento bacilar y daño tisular, lo cual sugiere que éstas participan en el control del crecimiento bacteriano. Así mismo, se observó una acción directa en la activación de DC's inmaduras mediado por receptores tipo toll (TLR's). En el modelo de TB crónica murina similar a la TB latente, la expresión de m β D-2 se observó a los 90 días postinfección correlacionando con el pico de expresión de IFN- γ y disminución de la expresión de IL-4 (15).

De la misma forma, en el modelo de TB progresiva, CRAMP (análogo murino de la catelicidina humana) incrementó su producción de forma considerable en la etapa temprana, particularmente en el día 1 post infección (PI), donde se demostró por inmunohistoquímica (IHQ) la gran expresión por parte de EC's y MØ's. El segundo pico de producción se observó en el día 21 PI, cuando existe la máxima actividad protectora mediada por células tipo Th1. Al día 60 PI se observó carga bacteriana incrementada, extensa neumonía y disminución de la expresión de este péptido. Durante la enfermedad latente, la catelicidina murina se mantiene incrementada, pero baja en comparación con el modelo de TB progresiva. Esta producción rápida de AMP's se pudiera relacionar con la observación de que la infección primaria por TB raramente lleva a la enfermedad activa. Quizá la CRAMP y las β defensinas pueden contribuir al mantenimiento de la infección latente de forma sinérgica (16).

La terapia génica en los modelos de TB pulmonar experimental surgen como una herramienta terapéutica prometedora. La sobreexpresión de citocinas protectoras claves en la infección con TB se propone como una terapia adyuvante en el control y prevención de la enfermedad. La administración única de adenovirus recombinantes que sobreexpresan Interferón- γ (Ad-IFN γ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (AdGM-CSF) han demostrado lo previamente mencionado.

Bajo el conocimiento de que IFN- γ tiene un importante papel como citocina protectora en la fase inicial de la TB pulmonar, la administración de Ad-IFN γ en la fase crónica de la enfermedad generó una disminución significativa de la carga bacteriana y de el área neumónica con respecto al adenovirus vacío (Ad-GFP). Éste mismo tratamiento contribuyó para la organización y formación de granulomas de mayor tamaño y cantidad. Tras la administración conjunta de Ad-IFN γ -quimioterapia convencional, los resultados obtenidos tuvieron mayor contundencia: menor carga bacteriana y menor neumonía con respecto al tratamiento solo con adenovirus. Resultados similares fueron obtenidos al utilizar un modelo

de TB progresiva con un aislado clínico resistente a primera línea de antibióticos (MDR) (17).

Con una estrategia experimental similar, se utilizó un adenovirus recombinante que sobreexpresa el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Ésta es una citocina pleoyotrópica con capacidad reguladora de la respuesta inflamatoria. Uno de sus papeles más importantes es la inducción de la diferenciación y activación de DC's. Como se ha reportado previamente, en modelos de TB experimental existe un retraso en el reclutamiento y maduración de DC's, contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune por parte de Mtb. Por tanto, GM-CSF surge como un fuerte candidato en terapia génica dirigida a TB (18). Los resultados observados reflejaron una inmunidad protectora incrementada con activación rápida de DC's, incremento en la producción de IFN- γ , TNF- α y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), permitiendo el control eficiente del crecimiento bacteriano y del daño histológico por neumonía, con generación de mayor número de granulomas y de mayor tamaño con respecto al adenovirus vacío (Ad70). El mismo tratamiento fue efectivo en la prevención de la reactivación de la infección crónica murina similar a la TB latente y en la transmisión (18).

Aunque el resurgimiento de la terapia génica con vectores adenovirales ha retomado gran importancia, la aplicación en el tratamiento de enfermedades infecciosas aun es escasa. Se propone el empleo de adenovirus recombinantes que sobreexpresen péptidos antimicrobianos (Ad-H β D3 y AdLL-37) en modelos de Tb pulmonar murina como herramienta adyuvante para el control de la enfermedad.

Definición del problema:

La tuberculosis es una enfermedad crónica con afección principalmente a pulmones, manifestándose como enfermedad activa y enfermedad latente. Se calcula que un tercio de la población se encuentra infectada con *M. tuberculosis*. Actualmente existen pocas herramientas para el control y la prevención de la enfermedad por lo que se requieren nuevas estrategias terapéuticas. Los péptidos antimicrobianos han demostrado ser una herramienta novedosa para el control de la enfermedad a través de su actividad antimicrobiana e inmunomoduladora.

Justificación:

El tratamiento para la TB es por periodos prolongados (6-18 meses) con diversos antibióticos (Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol y Estreptomina) con frecuencia con efectos colaterales importantes, lo que genera en muchas ocasiones abandono terapéutico, recaídas y aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR-TB) y extremadamente resistentes (XDR-TB) que complica el control de la enfermedad, por ello es necesario buscar nuevas alternativas que sean cortas, inocuas, efectivas. La terapia génica basada en adenovirus recombinantes que sobreexpresan péptidos protectores es potencialmente una forma novedosa y útil para tratar a la TB.

Hipótesis:

La administración de una sola dosis de Ad-H β D3/LL-37 permitirá controlar la TB pulmonar progresiva a través de su actividad antimicrobiana y quimioatrayente, activando una respuesta de tipo Th1. El mismo tratamiento también evitara la reactivación de la infección latente y la transmisión de la bacteria en estos modelos murinos

Fecha estimada de inicio:

03/08/2015

Fecha estimada de término:

31/08/2017

Comisión a la que somete

¿Incluye documentos anexos?:

Si

Investigadores participantes

(0) Comentarios

Investigador	Participación	Orden de participación	Investigador responsable
Hernandez Pando, Rogelio	Investigador responsable	1	Si
Marquina Castillo, Brenda Noemi	Investigador asociado	2	No
Mata Espinosa, Dulce Adriana	Investigador asociado	2	No
Barrios Payan, Jorge Alberto	Investigador asociado	4	No

Población vulnerable**(0) Comentarios****Población vulnerable vinculado al protocolo** Ninguna de las anteriores**Otra población::**

No aplica

Objetivos**(0) Comentarios****Objetivo:**

Evaluar el efecto inmunoterapéutico e inmunomodulador de la sobreexpresión de la B-defensina y la Catelicidina en la fase progresiva de la tuberculosis pulmonar murina

Evaluar la sobreexpresión de la B-defensina y la Catelicidina en la prevención de la reactivación de la infección crónica murina similar a la tuberculosis latente.

Evaluar la sobreexpresión de la B-defensina y la Catelicidina en la prevención a corto plazo de la transmisión de M. tuberculosis en convivientes sanos.

Evaluar el efecto inmunoterapéutico de la sobreexpresión de la B-defensina y la Catelicidina en sinergia con tratamiento convencional con Isoniazida, Rifampicina y Pirazinamida en la fase progresiva del modelo murino de TB pulmonar.

Evaluar el efecto inmunoterapéutico de la sobreexpresión de la B-defensina y la Catelicidina en la fase progresiva del modelo murino de TB pulmonar con una cepa multidrogoresistente (MDR)

Tipo de objetivo:

Específico (s)

Objetivo:

Evaluar el efecto inmunomodulador e inmunoterapéutico de la B-defensina y la Catelicidina en un modelo de TB pulmonar murina.

Tipo de objetivo:

General

Metodología: Diseño general**(0) Comentarios****Metodología gral:**

Ratones machos de la cepa BALB/C de 8 semanas de edad y 22 gr de peso proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ). Los animales serán anestesiados con vapor de sevoflurano (100 µL por ratón dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm) para su inoculación intratraqueal (IT) con 250,000 UFC de la cepa prototipo H37Rv de Mycobacterium tuberculosis extraídas en fase logarítmica a una densidad óptica de 0.400 a longitud de onda de 600 nm. Se corroborará con

...tinción de Ziehl-Neelsen, y se suspenderán en un volumen de 100 µl de buffer de fosfatos salino (PBS). Para la inoculación intratraqueal (IT), los animales se colocaran sobre una placa de unícel revestida con aluminio y se les sujetarán los incisivos con una liga de caucho, se introducirá una cánula de calibre 22G x 1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea. A los dos meses PI cuando la enfermedad este en fase avanzada se administrará 1 dosis de Ad-HβD3, AdLL-37, AdGFP o PBS por vía IT utilizando el mismo procedimiento para la infección descrito previamente y se evaluará el efecto terapéutico e inmunomodulador durante los días 7, 15, 30, 60 y 120 postratamiento. Así mismo se contará con un grupo de ratones a los cuales no se administrará el vector adenoviral (grupo PBS). Por cada día de sacrificio se tomarán 12 ratones por grupo. Se evaluará la cantidad de bacterias vivas por determinación de unidades formadoras de colonia (UFC), daño histopatológico (morfometría automatizada) y respuesta inmunológica (expresión de citocinas por qRT-PCR).

Se realizará una variante del modelo de TB progresiva previo con infección de un aislado clínico resistente a la primer línea de antibióticos (MDR) con 75,000 bacterias. A los dos meses PI, cuando la enfermedad este en fase avanzada se administrará 1 dosis de Ad-HβD3, AdLL-37, AdGFP o PBS por vía IT y se evaluará el efecto terapéutico e inmunomodulador durante la en los días 7, 15, 30, 60 y 120 postratamiento.

De la misma forma se evaluará el efecto adyuvante de la quimioterapia convencional tras la administración de los adenovirus terapéuticos, siguiendo el mismo modelo de enfermedad progresiva. Las dosis de antibióticos que se utilizarán son:

Administración vía Intragástrica 100µl de lunes a viernes:

- Rifampicina (10 mg/kg)
- Isoniazida (10 mg/kg)
- Pirazinamida (30 mg/kg)

Los antibióticos serán administrados en una solución única de lunes a viernes en un volumen de 100µl por ratón vía intragástrica (IG) por medio de la cánula ya mencionada anteriormente para el procedimiento de infección, siendo los ratones sujetados de la cédula y la parte superior de la cabeza para exponer la boca y rectificación del esófago. El procedimiento se llevará a cabo dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III en las instalaciones de patología experimental en el bioterio del INCMNSZ. Los ratones de cada grupo serán anestesiados con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal a una dosis de 29 mg/kg y sacrificados por exanguinación a los días 7, 14, 30, 60 y 120 de la infección por adenovirus. De cada individuo se obtendrán por disección ambos pulmones y bazo. Los pulmones serán perfundidos intratraquealmente con etanol absoluto para obtener una adecuada expansión alveolar y posterior análisis histológico. Así mismo, los pulmones, bazo y los sueros de los ratones de cada grupo, se congelarán inmediatamente en nitrógeno líquido postdisección y serán guardados a -70 grados centígrados hasta su procesamiento, para determinación de carga bacilar por conteo de UFC y para extracción de ácidos nucleicos. Todos los procedimientos se realizarán dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III.

En el modelo de latencia se evaluará, en grupos de 20 ratones, el efecto preventivo de la reactivación por la administración de los adenovirus recombinantes. Se utilizarán dosis bajas de Mtb H37Rv (4000 bacterias) para infectar ratones B6D2F1 por vía IT, con lo cual se induce tuberculosis crónica muy similar a TBL. Después de 5 meses se administrarán vía IT 1 dosis de Ad-HβD3, AdLL-37 o AdGFP. Después de un mes se administrará cortisona en el agua de bebida a una dosis de 3 mg/L para inducir reactivación de la enfermedad. Al término de este periodo se llevará a cabo el sacrificio como se mencionó previamente. La prevención de la reactivación de la enfermedad se evaluará por determinación de UFC y morfometría.

La contribución de esta forma de terapia génica en la prevención de la transmisión se evaluará en un modelo de convivencia entre ratones sanos e infectados vía IT con una dosis alta (250 000 bacterias cepa 5186) para inducir TB progresiva, 20 ratones sanos y 20 ratones infectados conviven por dos meses en el mismo microaislador (grupos de 5 infectados con 5 no infectados). Tres grupos de ratones no infectados recibirán el adenovirus respectivo (Ad-HβD3, AdLL-37 o AdGFP) vía IT, 1 grupo recibirá Isoniazida (10 mg/kg lunes a viernes vía IG) o PBS vía IG. Todas las intervenciones iniciarán un día antes de el inicio de convivencia. Previo sacrificio se realizará una prueba de hipersensibilidad retardada (DTH). Esta prueba consiste en la comparación del cambio de grosor del cojinete plantar de los ratones convivientes tras la administración de un derivado proteico purificado (PPD), por lo que se realizará una medición inicial del cojinete plantar derecho. Se administrarán 40ul de PPD rico en antígenos de Mtb (concentración 1.4mg/ml) en el cojinete plantar ipsilateral. Una vez transcurrido los 30 días de convivencia se realizará una medición comparativa con la inicial. Se evaluará la inmunoreactividad en contra de antígenos micobacterianos expresado en cambio de porcentaje de grosor de cojinete plantar. Esta prueba se realiza dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III. Después de 1 y 2 meses se sacrificarán como se describió previamente para evaluar carga bacilar por UFC, daño histológico.

Todo el material y desechos que tuvieron contacto con los adenovirus serán manejados e inactivados dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III. Los cadáveres de los ratones después del sacrificio se colocan en una bolsa roja ya que es la única que soporta un proceso de esterilización en una autoclave, dicha bolsa se etiqueta con la fecha y número de ratones sacrificados. Terminando el proceso de esterilización los desechos de los cadáveres ya estériles se colocan en una bolsa amarilla y se colocan en el almacén de residuos biológicos infecciosos producidos por el instituto.

Metodología: Criterios de selección

(0) Comentarios

Criterios de selección del protocolo: No aplica.

Beneficio (s) del estudio

(0) Comentarios

Beneficio: Evaluar el beneficio terapéutico de la administración de adenovirus recombinantes en el tratamiento y prevención de la tuberculosis pulmonar murina, siendo una alternativa novedosa con menores efectos adversos, mayor eficacia y que acorte el tiempo de tratamiento

Tipo de beneficio: Beneficios indirectos esperados

Metodología: Desenlace y variables

(0) Comentarios

Metodología de desenlace y variables: No aplica

Manejo de confidencialidad

(0) Comentarios

Acciones, estrategias y precauciones que serán tomadas para proteger la confidencialidad de la información de los pacientes.: No aplica

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto

(0) Comentarios

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto: No aplica

Riesgo (s) del estudio

(0) Comentarios

Molestias generadas por el estudio: No aplica

Complicaciones del procedimiento: No aplica

Efectos adversos reportados de medicamentos o sustancias utilizadas: No aplica

Métodos de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos: No aplica

Procedimientos a seguir para resolver los riesgos en caso de que se presenten: No aplica

Otro tipo de riesgo: No aplica

Consentimiento informado

(0) ComentariosHoja de informe al paciente: [PAT_1580_15_17_1.pdf](#)Carta de consentimiento informado: [PAT_1580_15_17_1.pdf](#)

Declaración de los investigadores

(0) ComentariosArchivo CEI 04 Declaración de investigadores: [Declaración_Investigadores.pdf](#)



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:

FOLIO DE REGISTRO: 'PAT-1580-15/17-1'

Fecha de registro del Protocolo: 13 de Julio de 2015

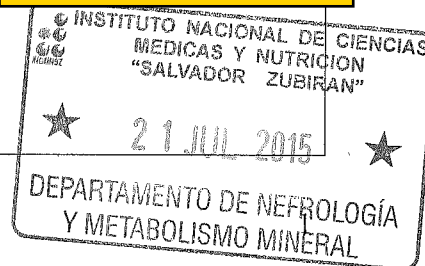
Título del Protocolo: "EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO E INMUNOMODULADOR DE LA β -DEFENSINA HUMANA 3 (HBD-3) Y LA CATELICIDINA (LL37) EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA"

Propuesta: a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dr. Rogelio Hernández Pando
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental
Teléfono	54870900 ext. 2185, 2194 y 7126
Correo electrónico	○ [Redacted]

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Dra. Dulce A. Mata Espinosa	INCMNSZ, Depto. de Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental	Doctor	54870900 ext. 2185 y 2194	○ [Redacted]
Dra. Brenda N. Marquina Castillo	INCMNSZ, Depto. de Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental	Doctor	54870900 ext. 2185 y 2194	○ [Redacted]
Dr. Jorge A. Barrios Payán	INCMNSZ, Depto. de Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental	Doctor	54870900 ext. 2185 y 2194	○ [Redacted]

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
○ [Redacted]	INCMNSZ, Depto. de Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental	Doctorado	5548609611	○ [Redacted]





FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Vigencia del Protocolo.			
		Mes	Año
Fecha estimada de inicio del protocolo		Agosto	2015
Fecha tentativa de finalización.		Agosto	2017

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

1) Institución en donde se realizará el proyecto:

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Patología y Anatomía Patológica, Sección de Patología Experimental

2) Objetivos Generales y específicos del protocolo:

Evaluar la H β D-3 (β -defensina) y LL-37 (catelicidina) en su efecto inmunomodulador e inmunoterapéutico en la TB pulmonar murina:

-Evaluar el efecto inmunoterapéutico e inmunomodulador de la sobreexpresión de la β -defensina y la Catelicidina en la fase progresiva de la tuberculosis pulmonar murina.

-Evaluar la sobreexpresión de la β -defensina y la Catelicidina en la prevención de la reactivación de la infección crónica murina similar a la tuberculosis latente.

-Evaluar la sobreexpresión de la β -defensina y la Catelicidina en la prevención a corto plazo de la transmisión de *M. tuberculosis* en convivientes sanos.

-Evaluar el efecto inmunoterapéutico de la sobreexpresión de β -defensina y la Catelicidina en sinergia con tratamiento convencional con Isoniazida, Rifampicina y Pirazinamida en la fase progresiva del modelo murino de TB pulmonar.

-Evaluar el efecto inmunoterapéutico de la sobreexpresión de β -defensina y la Catelicidina en la fase progresiva del modelo murino de TB pulmonar con una cepa multidrogoresistente (MDR).

3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

El tratamiento para la TB es por periodos prolongados (6-18 meses) con diversos antibióticos, presentando con frecuencia efectos colaterales importantes, condicionando abandono terapéutico, recaídas y aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR-TB) y extremadamente resistentes (XDR-TB) que complica el control de la enfermedad, por ello es necesario buscar nuevas alternativas que sean cortas, inocuas, efectivas. La terapia génica basada en adenovirus recombinantes que sobreexpresan péptidos protectores es potencialmente una herramienta terapéutica para el control de la enfermedad.

Procedimiento:



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Ratones machos de la cepa BALB/C de 8 semanas de edad y 22 gr de peso proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Los animales serán anestesiados con vapor de sevoflurano (100 μ L por ratón dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm) para su inoculación intratraqueal (IT) con 250,000 UFC de la cepa prototipo H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* extraídas en fase logarítmica a una densidad óptica de 0.400 a longitud de onda de 600 nm. Se corroborará con tinción de Ziehl-Neelsen, y se suspenderán en un volumen de 100 μ L de buffer de fosfatos salino (PBS).

Para la inoculación intratraqueal (IT), los animales se colocaran sobre una placa de unicel revestida con aluminio y se les sujetarán los incisivos con una liga de caucho, se introducirá una cánula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea. A los dos meses PI cuando la enfermedad este en fase avanzada se administrará 1 dosis de Ad-H β D3, AdLL-37, AdGFP o PBS por vía IT utilizando el mismo procedimiento para la infección descrito previamente y se evaluará el efecto terapéutico e inmunomodulador durante los días 7, 15, 30, 60 y 120 postratamiento. Así mismo se contará con un grupo de ratones a los cuales no se administrará el vector adenoviral (grupo PBS). Por cada día de sacrificio se tomarán 12 ratones por grupo. Se evaluará la cantidad de bacterias vivas por determinación de unidades formadoras de colonia (UFC), daño histopatológico (morfometría automatizada) y respuesta inmunológica (expresión de citocinas por qRT-PCR).

Se realizará una variante del modelo de TB progresiva previo con infección de un aislado clínico resistente a la primer línea de antibióticos (MDR) con 75,000 bacterias. A los dos meses PI, cuando la enfermedad este en fase avanzada se administrara 1 dosis de Ad-H β D3, AdLL-37, AdGFP o PBS por vía IT y se evaluará el efecto terapéutico e inmunomodulador durante la en los días 7, 15, 30, 60 y 120 postratamiento.

De la misma forma se evaluará el efecto adyuvante de la quimioterapia convencional tras la administración de los adenovirus terapéuticos, siguiendo el mismo modelo de enfermedad progresiva. Las dosis de antibióticos que se utilizarán son:

Administración vía Intragástrica 100 μ L de lunes a viernes:

- Rifampicina (10 mg/kg)
- Isoniazida (10 mg/kg)
- Pirazinamida (30 mg/kg)

Los antibióticos serán administrados en una solución única de lunes a viernes en un volumen de 100 μ L por ratón vía intragástrica (IG) por medio de la cánula ya mencionada anteriormente



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

para el procedimiento de infección, siendo los ratones sujetados de la cola y la parte superior de la cabeza para exponer la boca y rectificación del esófago. El procedimiento se llevará a cabo dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III en las instalaciones de patología experimental en el bioterio del INCMNSZ.

Los ratones de cada grupo serán anestesiados con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal a una dosis de 29 mg/kg y sacrificados por exanguinación a los días 7, 14, 30, 60 y 120 de la infección por adenovirus. De cada individuo se obtendrán por disección ambos pulmones y bazo. Los pulmones serán perfundidos intratraquealmente con etanol absoluto para obtener una adecuada expansión alveolar y posterior análisis histológico.

Así mismo, los pulmones, bazos y los sueros de los ratones de cada grupo, se congelarán inmediatamente en nitrógeno líquido postdisección y serán guardados a -70 grados centígrados hasta su procesamiento, para determinación de carga bacilar por conteo de UFC y para extracción de ácidos nucleicos. Todos los procedimientos se realizarán dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III.

En el modelo de latencia se evaluará, en grupos de 20 ratones, el efecto preventivo de la reactivación por la administración de los adenovirus recombinantes. Se utilizarán dosis bajas de Mtb H37Rv (4000 bacterias) para infectar ratones B6D2F1 por vía IT, con lo cual se induce tuberculosis crónica muy similar a TBL. Después de 5 meses se administrarán vía IT 1 dosis de Ad-H β D3, AdLL-37 o AdGFP. Después de un mes se administrará cortisona en el agua de bebida a una dosis de 3 mg/L para inducir reactivación de la enfermedad. Al término de este periodo se llevará a cabo el sacrificio como se mencionó previamente. La prevención de la reactivación de la enfermedad se evaluará por determinación de UFC y morfometría.

La contribución de esta forma de terapia génica en la prevención de la transmisión se evaluará en un modelo de convivencia entre ratones sanos e infectados vía IT con una dosis alta (250 000 bacterias cepa 5186) para inducir TB progresiva, 20 ratones sanos y 20 ratones infectados conviven por dos meses en el mismo microaislador (grupos de 5 infectados con 5 no infectados). Tres grupos de ratones no infectados recibirán el adenovirus respectivo (Ad-H β D3, AdLL-37 o AdGFP) vía IT, 1 grupo recibirá Isoniazida (10 mg/kg lunes a viernes vía IG) o PBS vía IG. Todas las intervenciones iniciarán un día antes de el inicio de convivencia. Previo sacrificio se realizará una prueba de hipersensibilidad retardada (DTH). Esta prueba consiste en la comparación del cambio de grosor del cojinete plantar de los ratones convivientes tras la administración de un derivado proteico purificado (PPD), por lo que se realizará una medición inicial del cojinete plantar derecho. Se administrarán 40ul de PPD rico en antígenos de Mtb (concentración 1.4mg/ml) en el cojinete plantar ipsilateral. Una vez transcurrido los 30 días de convivencia se realizará una medición comparativa con la inicial. Se evaluará la



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

inmunoreactividad en contra de antígenos micobacterianos expresado en cambio de porcentaje de grosor de cojinete plantar.

Esta prueba se realiza dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III. Después de 1 y 2 meses se sacrificarán como se describió previamente para evaluar carga bacilar por UFC, daño histológico.

Todo el material y desechos que tuvieron contacto con los adenovirus serán manejados e inactivados dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III.

Los cadáveres de los ratones después del sacrificio se colocan en una bolsa roja ya que es la única que soporta un proceso de esterilización en una autoclave, dicha bolsa se etiqueta con la fecha y número de ratones sacrificados. Terminando el proceso de esterilización los desechos de los cadáveres ya estériles se colocan en una bolsa amarilla y se colocan en el almacén de residuos biológicos infecciosos producidos por el instituto.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Categoría:	A:	B:	C:	D: XX	E:
------------	----	----	----	-------	----

5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.
Para mayor información el Investigador deberá consultar:
<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>
 Para la determinación de la carga bacilar, el análisis histológico, Citometría de Flujo y los estudios por biología molecular utilizaremos 12 animales por tiempo de sacrificio. Este es el número mínimo de animales que se requiere no solo para obtener las muestras necesarias y poder obtener una diferencia estadísticamente significativa. También es el mínimo requerido para poder publicar los resultados.
 Además se solicita un 10% mas de animales para el caso de las pérdidas durante el experimento.

6) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario.
NO APLICA

7) Mencione el número y las especies animales, así como el genero que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratón		21-22 g	49-56 semanas	Machos
No. de Grupos experimentales:	3 grupos/ 1 grupo/ 1 grupo			
No. de animales por grupo:	240 ratones/80 ratones/ 200 ratones (1 repetición)			
No. TOTAL DE ANIMALES:	2000 ratones (distribuidos en 2 años)			

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.
7 MESES por experimento

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	x		
Toma de muestras biológicas.		x	Al momento del sacrificio
Colocación de cánulas y sondas.		x	
Técnica para observación y modificación de conducta.	x		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.		x	1 vez. M tuberculosis intratraqueal 1 vez Adenovirus recombinantes
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	x		



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.		x	Al momento del sacrificio
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)	x		
Restricción física	x		
Confinamiento o aislamiento	x		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	x		
Inducción de lesiones	x		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	x		
Administración de sustancias químicas tóxicas.	x		
Implantes o injertos	x		
Estudios estereotáxicos.	x		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

INFECCION

Para infectar a los ratones se utilizara una cánula de calibre 22Gx1", el ratón es anestesiado con Sevoflurano (100uL por ratón dentro de una cámara de 20x20x20cm, no es recomendable utilizar Ketamina debido a que es un inductor de la producción de interleucinas de tipo antiinflamatorio lo que intervendría directamente en el desarrollo de nuestro experimento), una vez anestesiado se sujetara sobre una placa de aluminio utilizando una liga de caucho sobre los incisivos del animal, se localizara la tráquea apoyándose con el tacto y la cánula, una vez localizada se inyectaran 250,000 UFC de *M. tuberculosis*/100ul de SSI, este procedimiento solo se realizara una vez al inicio del experimento y se hará bajo condiciones de bioseguridad nivel III.

EUTANASIA

Los animales serán inyectados con Pentobarbital 210 mg/kg. IP. Se expondrá la cavidad peritoneal y torácica para recolectar, el bazo y los pulmones, las muestras se colocaran dentro de criotubos de 2 ml.

11) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Anestésico	Sevoflurano	100 µL	Inhalada	Una vez.
	Pentobarbital	210 mg/Kg	IP	Una vez.

12) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?
Relajación muscular, pérdida del reflejo ocular

13) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

NO APLICA



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

14) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal			X	
b) Apariencia			X	
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)				X
d) Conducta espontánea.	X			
e) Conducta provocada.			X	

15) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

- Piloerección
- Adinamia
- Peso
- Taquipnea
- Postura

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

a. Variación de peso corporal:

1. Aceptable disminución del 5-10% en un lapso corto.
2. Moderada del 10-20%
3. Substancial > al 20% (criterio de punto final).

b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:

1. 0 si es normal.
2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
3. 2 si está afectado
4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care

http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

16) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?
Pentobarbital 210mg/kg IP

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

17) El protocolo representa riesgo biológico?

a) No b) Si

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5_sect_V.pdf

18) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?
Los cadáveres serán colocados dentro de una bolsa de plástico de color rojo resistente a un ciclo de esterilización por vapor (121oC/20lb/in2/30 min), una vez terminado el ciclo la bolsa se colocara dentro de una bolsa de plástico de color amarillo, impermeable con la leyenda "PELIGRO, RESIDUOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS". Se trasladaran al depósito del INCMNSZ.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Nombre y firma del Investigador Responsable
Dr. Rogelio Hernández Pando



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA
CINVA DEL INCMNSZ.

	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- D) SE TESTA FOTO DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**