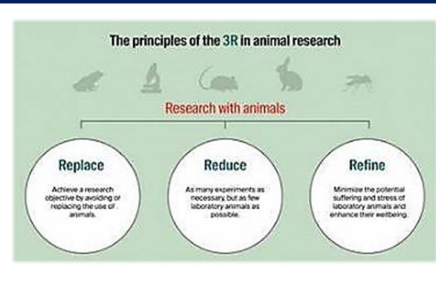
APLICACIÓN DEL "REFINAMIENTO", COMO PRINCIPIO CLAVE DE LAS 3RS, EN LOS PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES CON PNH COMO "BIOMODELO CRÍTICO", Y SU NECESIDAD PARA EL USO EFECTIVO EN LOS ENSAYOS NO CLÍNICOS IN VIVO DESARROLLADOS EN CENPALAB EN LOS ÚIMOS 4 AÑOS.

Jay P, Daniel[1]; Sosa T, Iliana M[1]; Mancebo R, Axel A[1]; Boza M, Claudia[1]; Contreras P, Francisco[1]; Balmaceda B, Rodolfo E[1]; Rodríguez R, Eduardo[1]; Ballart T, Nordan[1]; Carmenate D, Midalis[1]; Contreras B, Ana B[1]; Valdés F, Odalis M[1]; León G, Avelina[1]; Hernández S, Osvaldo[1]; González R, Roberto[1]; Orphee S, Romy S[1]; Brito Ll, Adriel[2]; Castillo R, Rebeca[1]; Pérez M, Ileana[1].

1) Centro Nacional Para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). 2) Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL) de la Universidad de La Habana (UH).

The current scenarios of the science of NHPs as laboratory animals, and the current situation of several pathologies of world importance, demand animal welfare in *in vivo* non-clinical trials of products and devices, with a safety high level and without compromising efficacy. The GBP and GLP include guaranteeing the welfare of the animals involved, in their management, care and use, as experimental biomodels. The 3R principle is a sufficient and effective approach to ethical challenges in the progress of biomedical research and the changing status of animals in research. "Refinement" is the least valued, it encompasses veterinary medicine and associated biomedical research, and animal welfare is crucial in the interaction. Objective: Show the application of new and rescued methodologies, techniques, and procedures, as a principle of "refinement", based on the welfare of NHPs as biomodels, through clinical and zoometric evaluation results in 12 *in vivo* non-clinical trials carried out in CENPALAB in the last 4 years. These were selected and applied in coherence with the studies needs and specifications. installations: maintenance, modification, adaptation and/or automation of housing (cages), feeders, drinkers, lighting and air conditioning; environmental enrichment: adaptation of the elements of the environment, establishment of pools for bathing/toileting; food enrichment/supplementation: fruits and forage; selection of relevant species, sexes and age strata; identification system: 1st) unique and invasive (clip), 2nd) intragroup and non-invasive (shaving); holding/handling: manual physics/instrumented , chemistry, combined; thermometry: selection of measurement instrument, unit, site and frequency; cardio-pneumometry: method selection (manual/instrumented), visual/tactile/sound/electric; complementary diagnostic tests: ophthalmology, brain electrical activity (EEG), imaging (RX, US), zoometry: skull, extremities and appendages, administration site; selection of corresponding examinations and sampling: clinical (urine, blood, CSF), microbiology (feces, nasal, oral and rectal exudate), pathological anatomy; and analysis of physiological parameters. As well as qualification in methods, techniques and technologies, and professional improvement; advice and training. 12 studies were involved with products against COVID-19, dengue, rheumatoid arthritis, cancer and neurodegenerative diseases. Results: Obtaining data in higher quality and quantity, innovative, with greater reliability and less variability; process of establishing acceptable ranges and characterization of the model in our conditions; opportunity to update and implement SOP in this species, and the associated TI and specifications; achieve greater complacency, welfare and animal's adequate end point. Conclusions: In the experimental context of *in vivo* non-clinical trials, especially with PNH, the principle of "refinement" has clinical significance in the action first line to achieve the welfare of animals as experimental biomodels. Keywords: laboratory animals, PNH, animal welfare, *in vivo* non-clinical trials, 3R, refinement.

INTRODUCCION

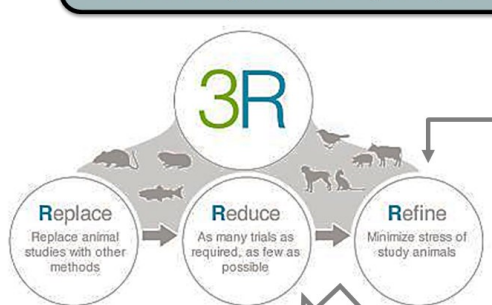


El principio de las 3R en el Uso de Animales de Laboratorio, ha ido ganando protagonismo en la comunidad científica.

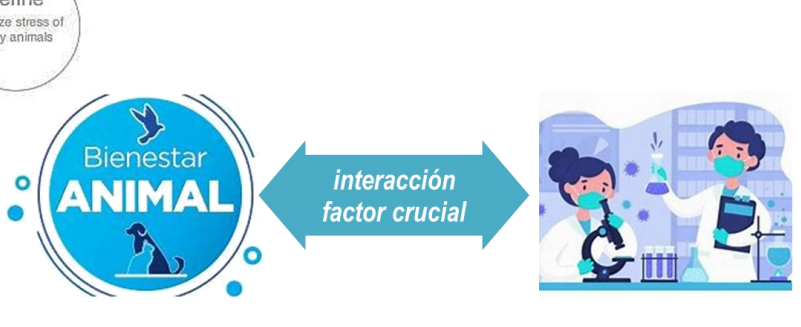
enfoque suficiente y eficaz para los desafíos éticos del uso de animales en la investigación

progreso en la investigación biomédica — *lo revela* — *estatus cambiante de los animales*

El aplicar las BPP y BPL, incluye garantizar el BIENESTAR DE LOS ANIMALES involucrados, en su manejo, cuidado y uso, como biomodelos experimentales.



REFINAMIENTO" es la menos valorado de las 3Rs abarca la *Medicina Veterinaria* y la *Investigación Biomédica* asociada.

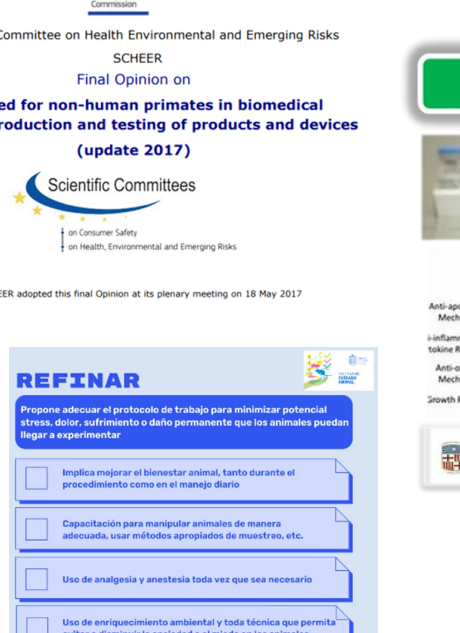


El refinamiento se considera una parte no instrumental del proceso de generación de datos y, por lo tanto, el refinamiento innovador de los enfoques experimentales

biomodelos filogenéticamente más cercanos al humano

en muchas ocasiones son la opción más acertada como biomodelo

- Obtener más datos por animal y sesión de experimentación
- Compartir los datos
- Publicar los resultados (incluido los negativos o nulos)
- Evaluar la calidad del cuidado de los animales
- Evaluar los niveles de angustia
- Mejorar efectivamente los procedimientos con animales
- Instrucción, formación y superación suficientemente de cuidadores e investigadores
- Aplicar de técnicas de imagenología
- Aplicar avances tecnológicos en procedimientos quirúrgicos y de otro tipo
- Aplicar y actualizar los protocolos de anestésica y analgésia
- Adoptar y aplicar métodos no invasivos
- Caracterización de los PNH para continua refinación de los biomodelos



OBJETIVO

Exponer la **aplicación de metodologías, técnicas, y procedimientos nuevos y rescatados**, a la luz del principio de "refinamiento", en función del bienestar de los PNH como biomodelos, en ensayos no clínicos *in vivo* realizados en los últimos 4 años, con la perspectiva de **implementarlo** en el contexto experimental de nuestro centro.

MATERIALES Y METODOS

12 estudios: Antiviral (7) — vs SARS-Cov-2 (6), vs Dengue (1); Neuroprotector (2) — Neuro-EPO (2); Antirreumático (1) — Jusvinza (1); Anticancerígeno (1) — anti-CD20-CHO (1)

vs SARS-Cov-2: Soberana 01, Soberana 02, Soberana Plus, Nasalferón, Abdala y Mambisa

Neuro-EPO — Jusvinza — vs Dengue: Tetra NSC-ODN, Tetra NSC-AMPc — anti-CD20-CHO

SELECCIÓN DE RELEVANCIA
- Especies
  - Mono Resus (*Macaca mulatta*)
  - Mono Irus (*Macaca facicularis*)
  - Mono Verde (*Chlorocebus aethiops sabaeus*)
- Sexo
- Estratos Etarios

SIST. DE IDENTIFICACIÓN
1ra) única e invasiva (presilla)
2da) intragrupal y no invasivo (rasurado)

INSTALACIONES Y ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL Y ALIMENTARIO

Mantenimiento y aumento capacidad alojamiento: jaulas, comederos, bebederos, luz, clima, piscinas para baño/aseo.

MANIPULACIÓN/SUJECIÓN

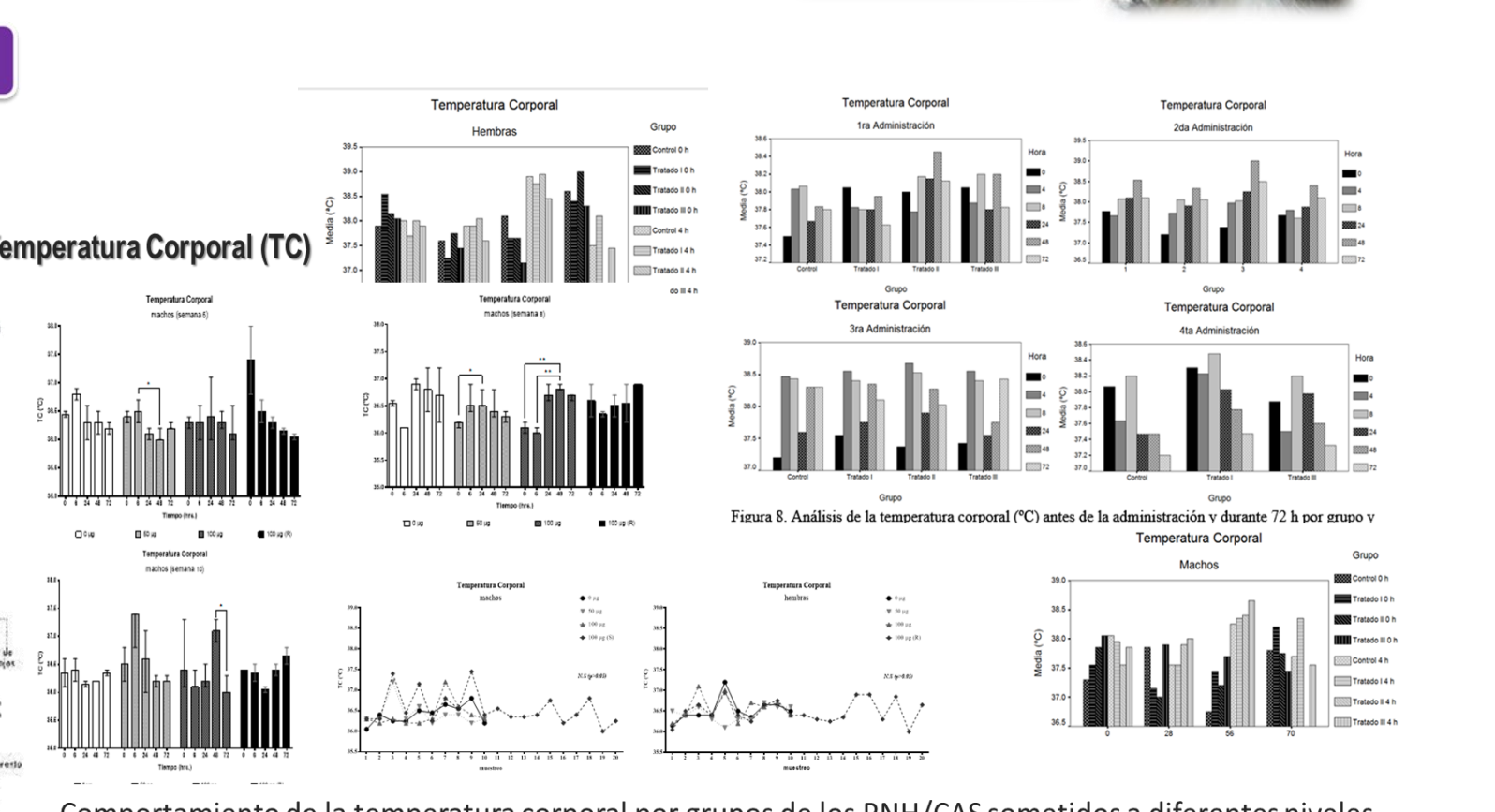
- **RESTRICCIÓN QUÍMICA**
  - *sedación: **clorhidrato de ketamina (IM), 2-20 mg/kg***
- **RESTRICCIÓN FÍSICA MANUAL**
  - *sujeción mediante la **cola, piel dorso-cervical, brazos, piernas***
  - ***brazos paralelos** en sentido caudal en la zona **dorsal**, juntos c/ la **cola***
- **RESTRICCIÓN FÍSICA INSTRUMENTADA**
  - *cepo p/ primates*
- **RESTRICCIÓN COMBINADA**
  - *balance e/ min. sedación necesaria y viable manipulación no estresante*
- **VIAS DE EXTRACCIÓN/ ADMÓN.**
  - *IN/PO:*
    - *sujeción de la **cabeza** por encima de la **región fronto-parietal** y por debajo de la **mandíbula inferior***
    - *elevar la **cabeza** a **posición vertical***
    - *mantener la posición por ≈ **30 seg**.*
  - *IV:*
    - *postura p/ extracción: **sedente**, sujeción de pierna, exponer cara interna del muslo (**vena femoral**).*
    - *postura p/ admón: de **cúbito esternal**, sujeción de pierna exponer cara posterior (**vena safena**).*
  - *PUNCIÓN LUMBAR:*
    - *postura: **sedente cifosis lumbar profunda** (espacios intervertebrales L3-L4 y L4-L5).*
    - *sedación y anestesia local (lidocaína)*

MÉTODOS DE TERMOMETRÍA (SELECCIÓN DE SITIO, EQUIPO)

- rectal (TR): termómetro clínico digital → tiempo reducido de medición (60 seg.) → pantalla LCD digital (no error de lectura)
- piel (TP): termómetro infrarrojo sin contacto → radiación térmica infrarroja → región frontal o esternal (previo rasurado)
- conducto auditivo (TO): termómetro infrarrojo → radiación térmica infrarroja → previa limpieza, conducto recto (estirar oreja atrás/arriba)

Medición pre-sedación (módulos individuales)
Medición post-sedación (mesa de trabajo)

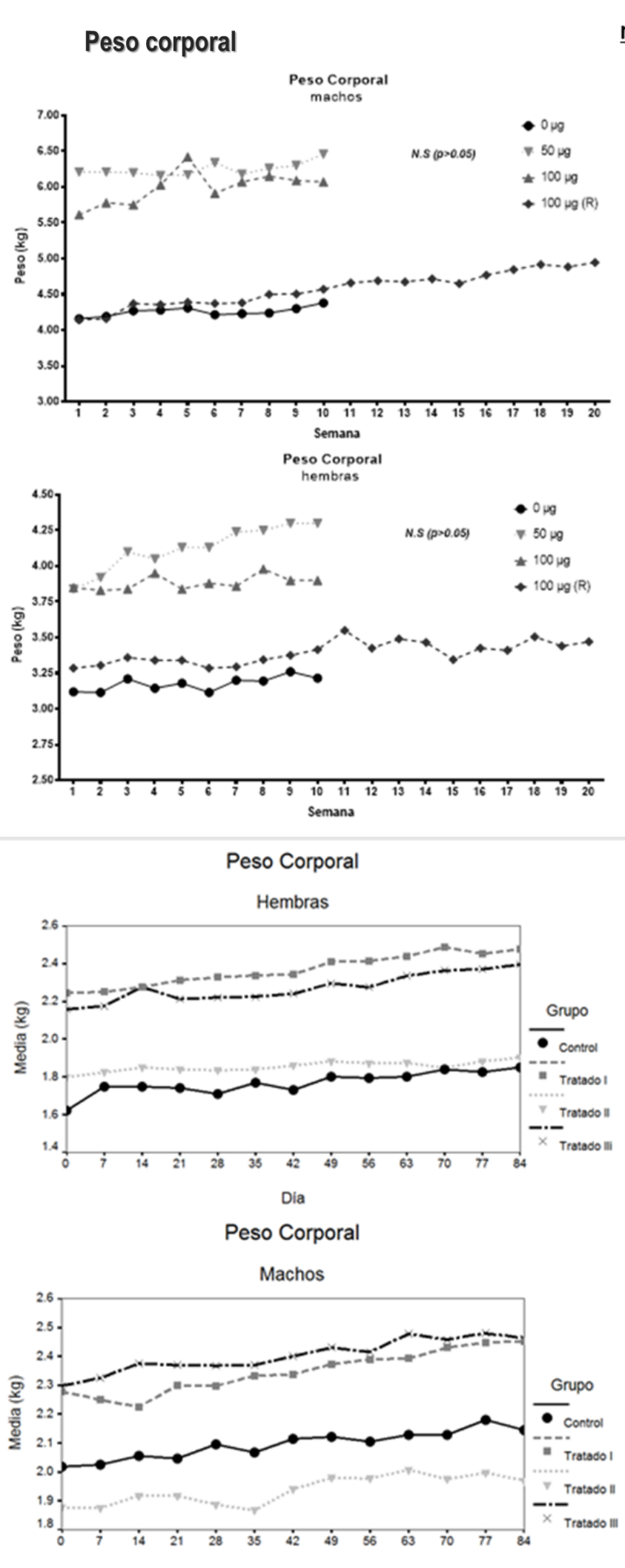
SELECCIÓN
- instrumento
- unidad
- sitio
- frecuencia



Comportamiento de la temperatura corporal por grupos de los PNH/CAS sometidos a diferentes niveles de dosis. Los valores de las ordenadas representan la mediana. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (p>0,05).

TOLERANCIA LOCAL, TERMOMETRÍA LOCAL Y ZOOMETRÍA

Peso corporal



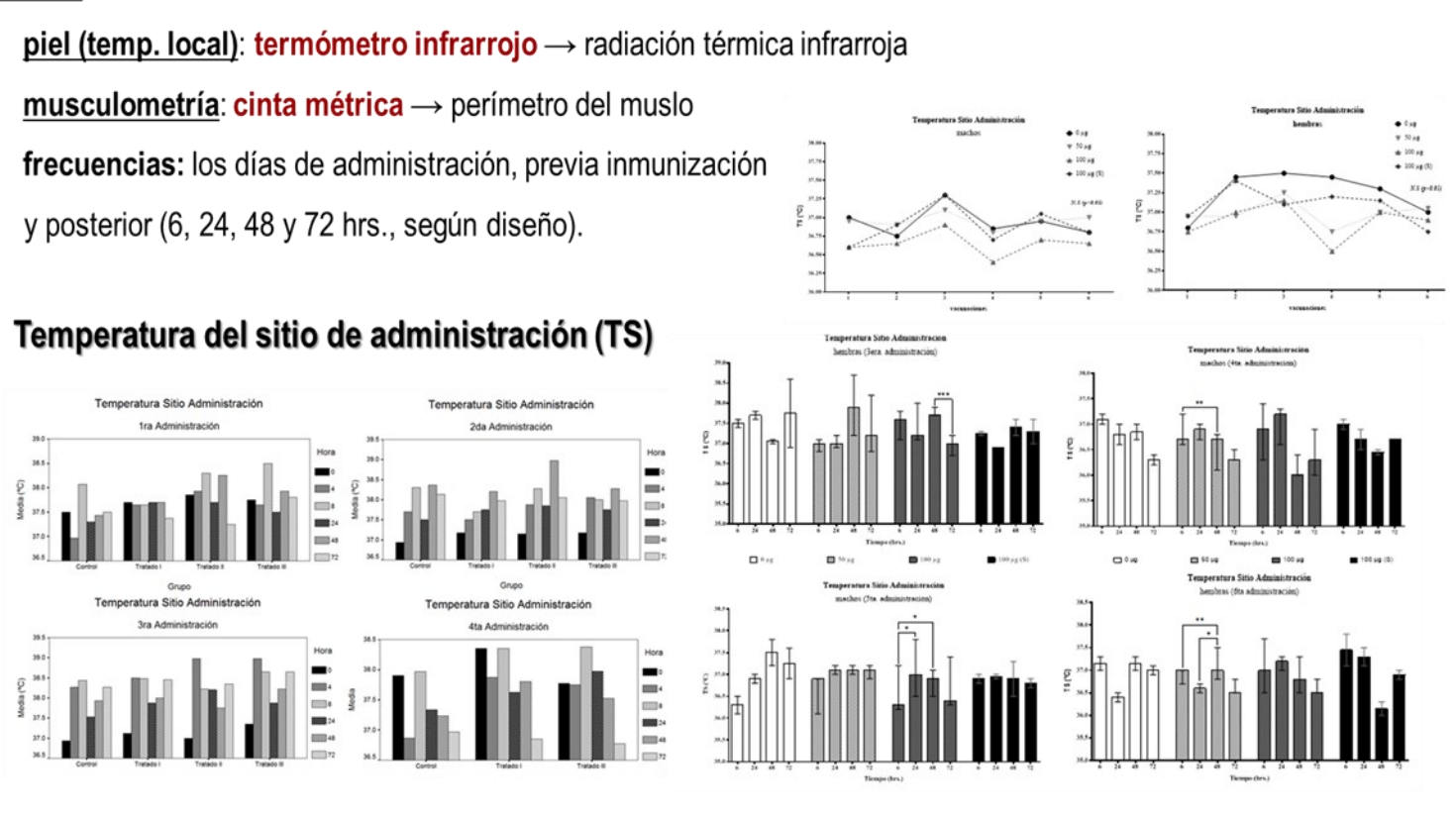
Comportamiento del peso corporal por grupos de los PNH/CAS sometidos a diferentes niveles de dosis. Los valores de las ordenadas representan la mediana. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ni en el tiempo. Pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis, Mann-Whitney y Friedman (p>0,05).

Temperatura del sitio de administración (TS) y Evaluación de la Inflamación Local (musculometría)

método

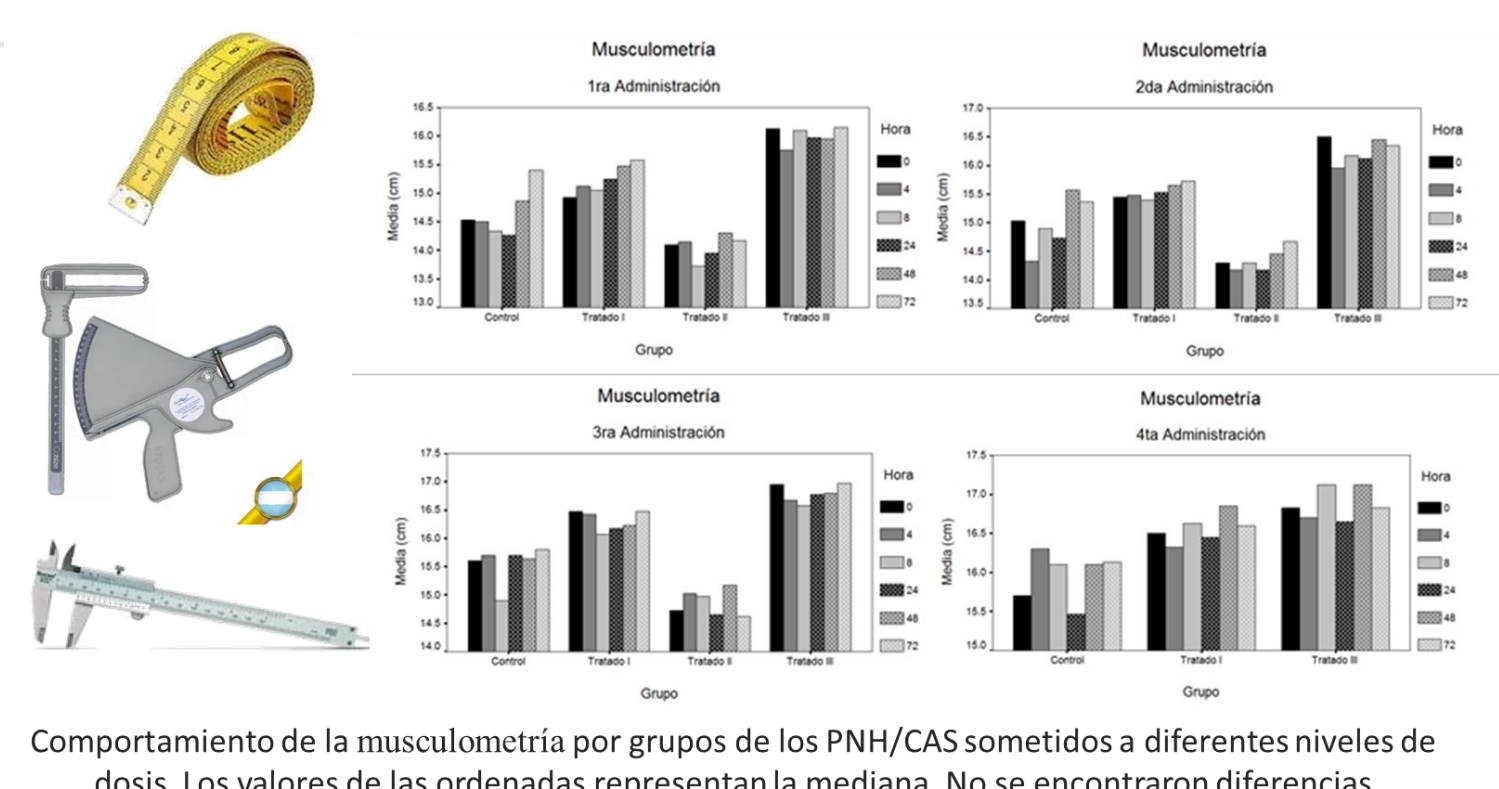
- piel (temp. local): termómetro infrarrojo → radiación térmica infrarroja
- musculometría: cinta métrica → perímetro del muslo
- frecuencias: los días de administración, previa inmunización y posterior (6, 24, 48 y 72 hrs., según diseño).

Temperatura del sitio de administración (TS)



Comportamiento de la temperatura del sitio de administración por grupos de los PNH/CAS sometidos a diferentes niveles de dosis. Los valores de las ordenadas representan la mediana. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (p>0,05).

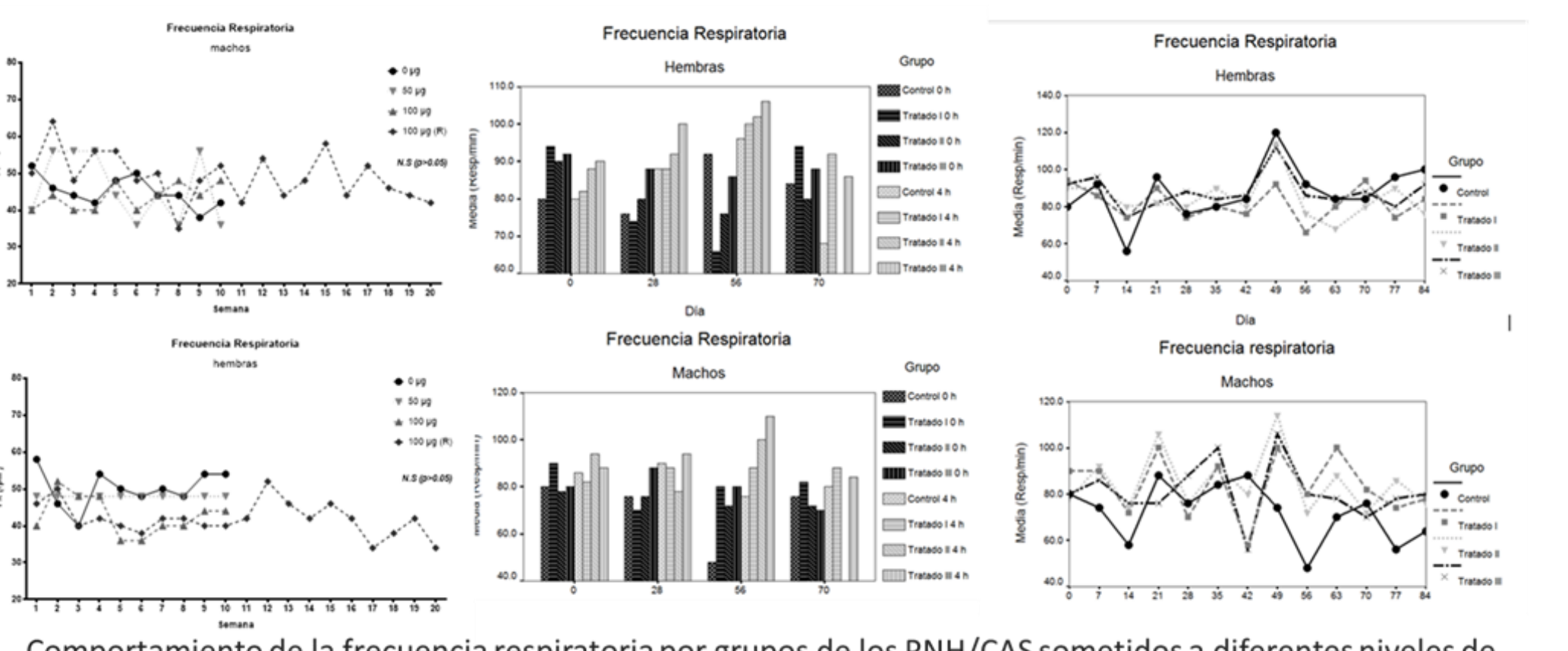
No se observaron efectos de edema ni eritema en el sitio de administración.



Comportamiento de la musculometría por grupos de los PNH/CAS sometidos a diferentes niveles de dosis. Los valores de las ordenadas representan la mediana. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (p>0,05).

FRECUENCIA RESPIRATORIA

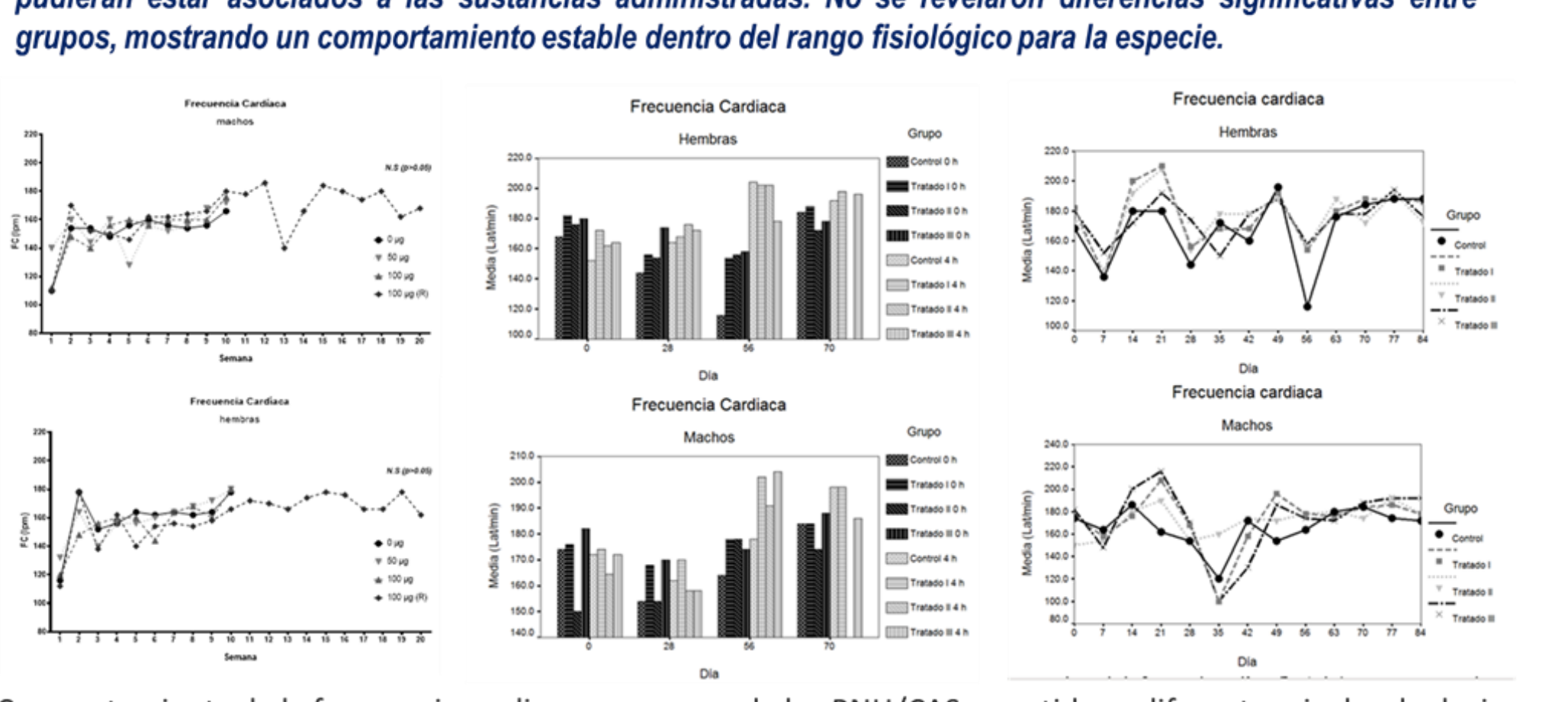
Los animales no mostraron signos y/o síntomas de compromiso respiratorio, vital o de relevancia que pudieran estar asociados a las sustancias administradas. No se revelaron diferencias significativas entre grupos, mostrando un comportamiento estable dentro del rango fisiológico para la especie.



Comportamiento de la frecuencia respiratoria por grupos de los PNH/CAS sometidos a diferentes niveles de dosis. Los valores de las ordenadas representan la mediana. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ni en el tiempo. Pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis, Mann-Whitney y Friedman (p>0,05).

FRECUENCIA CARDIACA

Los animales no mostraron signos y/o síntomas de compromiso cardiovascular, vital o de relevancia que pudieran estar asociados a las sustancias administradas. No se revelaron diferencias significativas entre grupos, mostrando un comportamiento estable dentro del rango fisiológico para la especie.



Comportamiento de la frecuencia cardiaca por grupos de los PNH/CAS sometidos a diferentes niveles de dosis. Los valores de las ordenadas representan la mediana. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ni en el tiempo. Pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis, Mann-Whitney y Friedman (p>0,05).

EXÁMENES CLÍNICOS Y MUESTREO

Uroanálisis

Análisis cuantitativo y cualitativo, de forma general o parcial, a nivel físico, químico, celular y microbiológico de ORINA muestreada.

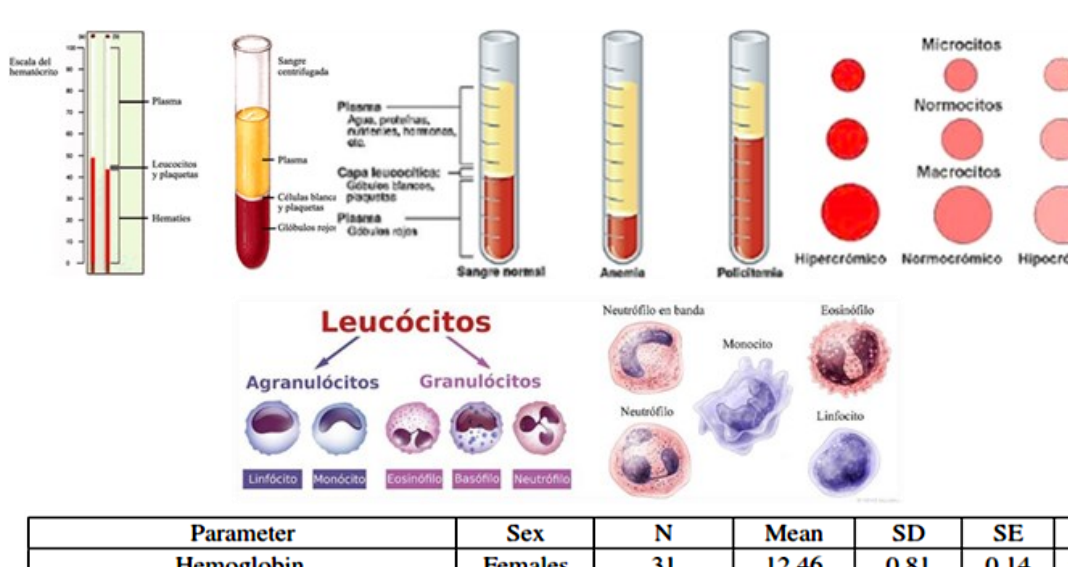
Coprología

Análisis cuantitativo y cualitativo, a nivel físico, químico, celular y microbiológico de HECES FECALES muestreada (frasco / exudado rectal). color, consistencia, cantidad, forma, olor, presencia de mucosidad, sangre, microorganismos

Recolección y análisis de LCR

- Apariencia
- Glucosa en LCR (mg/mL)
- Cloruro (mEq/L)
- Proteína total en LCR (mg/mL)
- Gamma globulina (%)
- Conteo de células blancas (GB)
- Presencia de células rojas (+/-)

Hemograma y Bioquímica sanguínea



Parameter	Sex	N	Mean	SD	SE	
Hemoglobin. (g/dl)	Females	31	12.46	0.81	0.14	n.s.
	Males	33	12.70	1.18	0.20	
Hematocrit (%)	Females	31	37.98	5.35	0.96	n.s.
	Males	33	38.40	6.12	1.06	
Erythrocyte count. ($x10^6/\mu l$)	Females	18	5.01	0.37	0.08	n.s.
	Males	18	4.95	0.47	0.11	
Platelet count. ($x10^3/\mu l$)	Females	27	316.63	124.16	23.89	n.s.
	Males	27	358.52	116.74	22.46	
Mean corpuscular volume. (fl)	Females	18	72.22	9.13	2.15	n.s.
	Males	18	73.00	8.99	2.12	
Mean corpuscular hemoglobin. (pg)	Females	18	25.27	1.40	0.33	n.s.
	Males	18	26.02	0.99	0.23	
Mean corpuscular hemoglobin concentration. (g/dl)	Females	18	35.54	4.61	1.08	n.s.
	Males	18	36.25	5.03	1.18	
Leukocyte count ($x10^3/\mu l$)	Females	31	7.63	2.14	0.38	n.s.
	Males	33	7.38	2.22	0.38	
Neutrophils (%)	Females	31	36.32	17.30	3.10	n.s.
	Males	33	29.30	19.36	3.37	
Lymphocytes (%)	Females	31	60.77	18.03	3.23	n.s.
	Males	33	67.76	20.76	3.61	
Monocytes (%)	Females	31	1.65	2.45	0.44	n.s.
	Males	33	1.67	2.26	0.39	

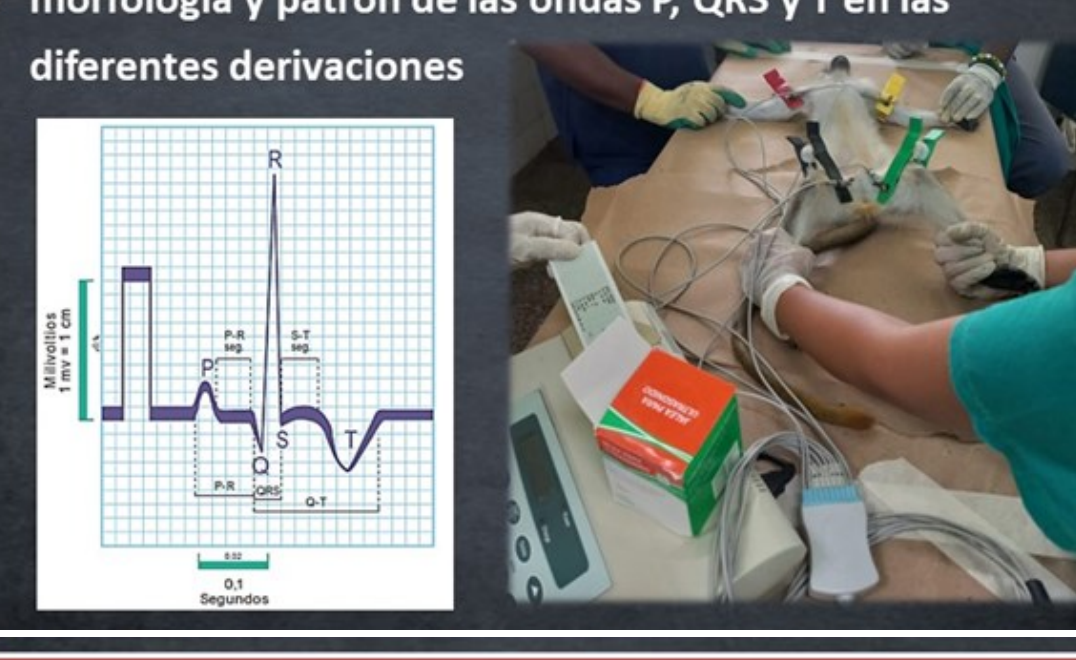
Parameter	Sex	N	Mean	SD	SE	
Alkaline phosphatase (U/l)	Females	33	923.06	309.69	53.91	n.s.
	Males	33	1038.39	328.36	57.16	
Creatinine (μmol/l)	Females	24	65.61	11.64	2.37	n.s.
	Males	24	66.62	11.65	2.37	
Glucose (mmol/l)	Females	33	6.02	2.25	0.39	n.s.
	Males	33	6.25	3.03	0.52	
Aspartate aminotransferas (U/l)	Females	33	59.58	26.05	4.53	n.s.
	Males	33	64.94	41.72	7.26	
Alanine aminotransferase (U/l)	Females	33	39.88	18.90	3.29	n.s.
	Males	33	59.00	54.76	9.53	
Total proteins (g/dl)	Females	33	6.74	0.54	0.09	n.s.
	Males	33	6.51	0.63	0.11	
Uric acid (μmol/l)	Females	18	10.79	6.52	1.53	n.s.
	Males	18	8.24	4.44	1.04	
Glutamil transpeptidase (U/l)	Females	9	57.89	17.05	5.68	n.s.
	Males	9	57.00	13.10	4.36	
Total cholesterol (mmol/l)	Females	33	3.61	0.52	0.90	n.s.
	Males	33	3.63	0.77	0.13	
Triglycerides (mmol/l)	Females	24	0.43	0.23	0.04	n.s.
	Males	24	0.41	0.30	0.06	
Albumin (G/l)	Females	24	47.91	4.75	0.97	n.s.
	Males	24	46.64	3.99	0.81	
Total bilirubin (μmol/l)	Females	24	4.96	3.78	0.77	n.s.
	Males	24	4.54	2.47	0.50	
Phosphorus (mmol/l)	Females	24	2.25	0.52	0.10	n.s.
	Males	24	2.10	0.66	0.13	
Serum Ionogram						
Potassium (mmol/l)	Females	24	3.93	0.24	0.05	n.s.
	Males	24	3.69	0.24	0.05	
Chloride (mmol/l)	Females	15	105.3	2.18	0.56	n.s.
	Males	15	105.3	1.96	0.51	
Calcium (mmol/l)	Females	33	2.41	0.19	0.03	n.s.
	Males	33	2.39	0.25	0.04	

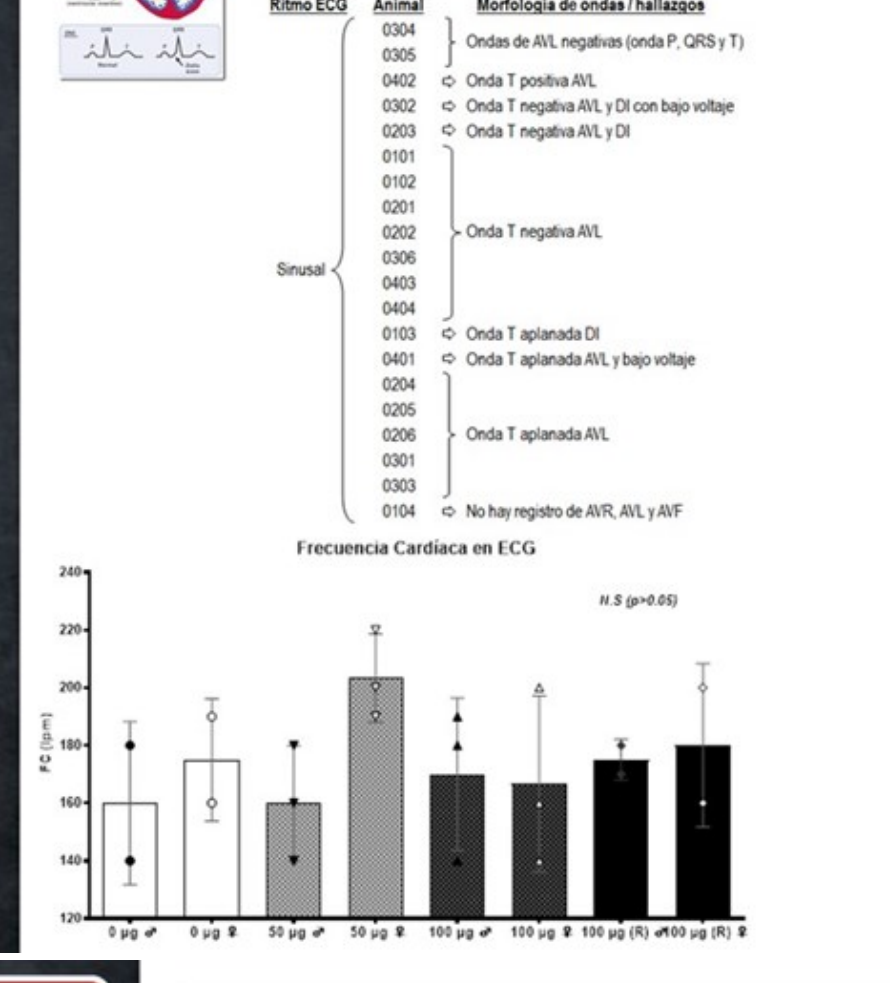
OTROS EXAMENES
- Electroencefalograma (EEG)
- Radiografía (RX)
- Ultrasonido (US)

EXAMEN OFTALMOLOGICO
- inspección clínica del ojo
- reflejo pupilar
- visión lateral (visión periférica)
- motilidad ocular
- **frontal del ojo** (párpado, córnea, esclerótica , iris y cristalino)

EXÁMENES DIAGNÓSTICOS COMPLEMENTARIOS

ELECTROCARDIOGRAMA (ECG)
- ritmo sinusal
- ritmo ECG (*regularidad de sucesión de los complejos QRS*)
- frecuencias cardiacas en ECG
- morfología y patrón de las ondas P, QRS y T en las diferentes derivaciones



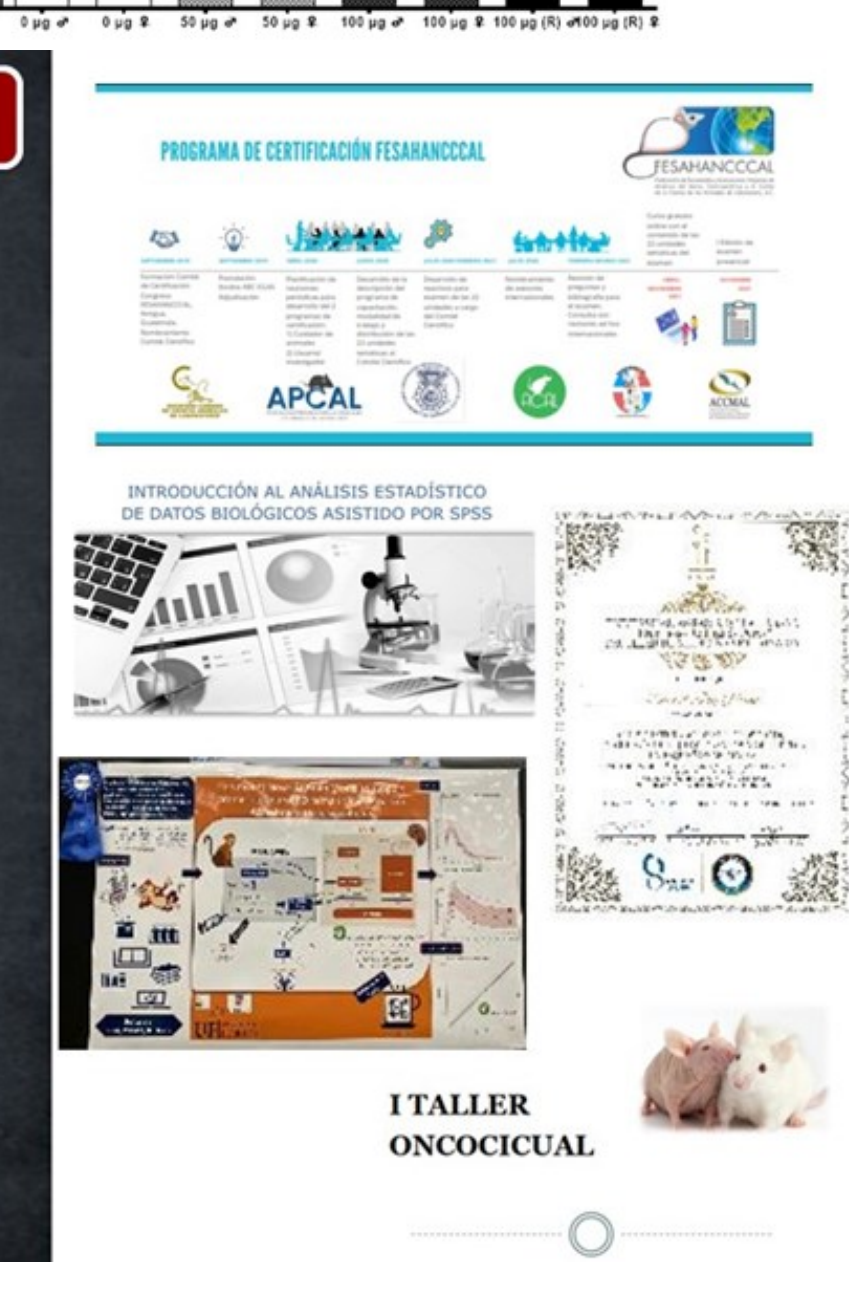


ANATOMÍA PATOLÓGICA - Biopsia Nasal

- Determinación del potencial irritante con administración nasal a dosis repetida del candidato vacunal CIGB-669 (Mambisa), antígeno contra el SARS-Cov-2, en Chlorocebus aethiops sabaeus (2022).
- Diseño subcrónico con administración nasal a dosis repetida del candidato vacunal CIGB-669 (Mambisa), antígeno contra el SARS-Cov-2, en Chlorocebus aethiops sabaeus (2022).

CAPACITACIÓN Y SUPERACIÓN PROFESIONAL

- Programa de certificación FeSAHANCCCAL para "Cuidador de Animales de Laboratorio y para Investigador/Usuario de Animales de Laboratorio: 11 certificados.
- IV Taller Nacional de Primatología: 10 participantes.
- Introducción al análisis estadístico de datos biológicos asistido por SPSS: 11 cursantes.
- Curso Internacional en Cirugía de tejidos blandos en pequeños animales: 2 cursantes.
- ASCPT 2023 Annual Meeting. Premio: Presidential Trainee Award: 3 participantes.
- Entrenamiento en Extracción por punción lumbar de LCR (Hospital Militar Central Universitario Dr. Carlos J. Finlay): 1 entrenado.
- Eventos Científicos.



I TALLER ONCOCICUAL

CONCLUSIONES

- *Obtención de datos en mayor calidad y cantidad, novedosos, con mayor fiabilidad y menor variabilidad.*
- *Proceso de establecimiento de rangos aceptables y caracterización del modelo en nuestras condiciones.*
- *Oportunidad de actualizar e implementar POT en esta especie, y los IT y ES asociados.*
- *Lograr mayor complacencia, bienestar y adecuado punto final de los animales.*

En el contexto experimental de ensayos no clínicos in vivo, en especial con PNH, el principio de "refinamiento" tiene una trascendencia clínica en la primera línea de acción para lograr el bienestar de los animales como biomodelos experimentales.