

# **Regulaciones, Uso y Tecnología Empleada en Animales en Investigación Biomedica**

Victor H. Monterroso, MV, MS, PhD, DACLAM

Director

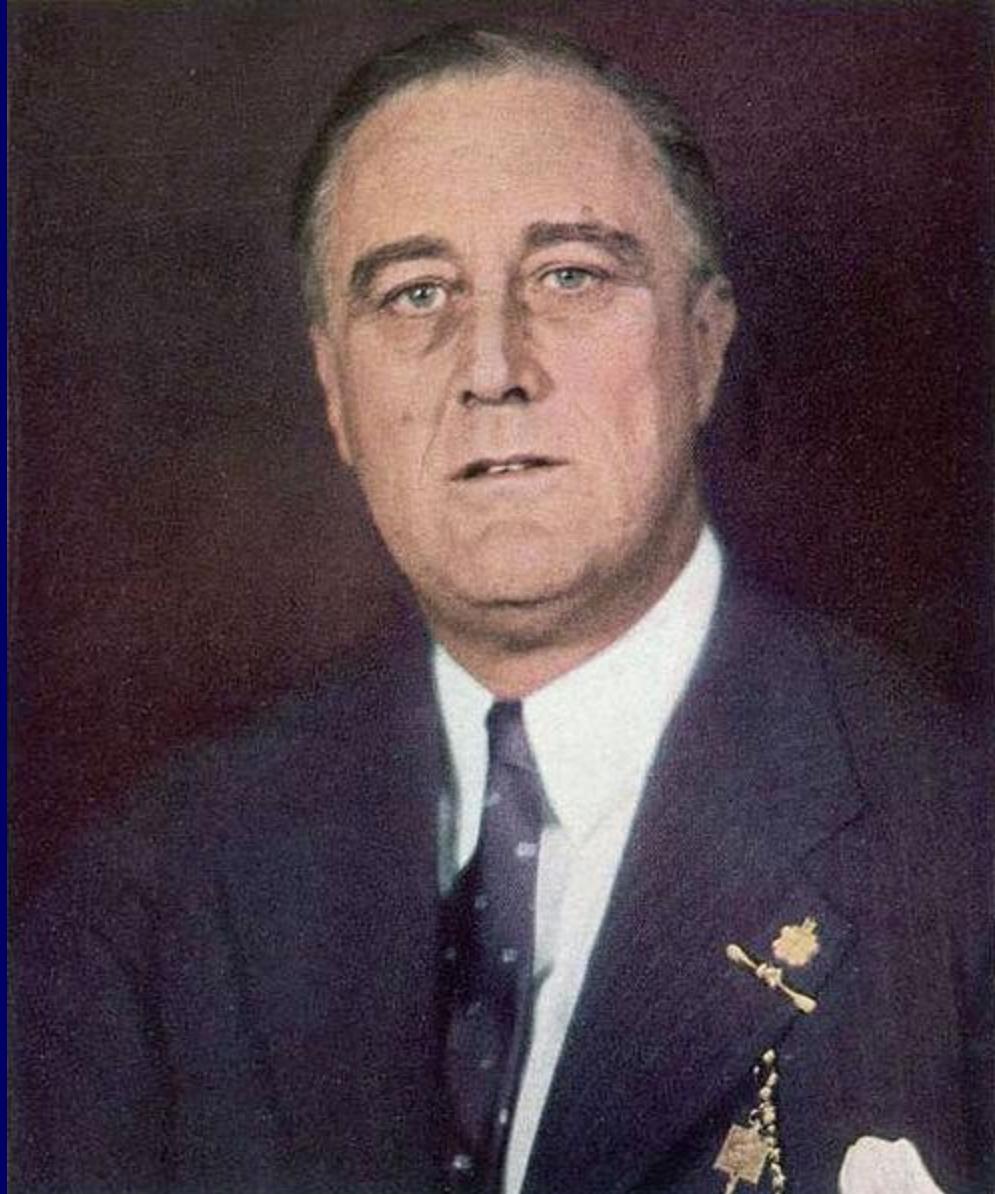
Division of Laboratory Animal Services

Georgia Regents University

# Introducción

- Nuestras vidas son tocadas diariamente por descubrimientos y avances biomedicos
  - Substitutos de azucar (dieta o regular)
  - Vacunas
  - Pruebas de Diagnóstico (ELISA, MRI, CT-scan, etc)
  - Antibioticos, analgesicos, presión arterial, etc
- Nuestro futuro quizas sea tocado por nuevos avances
  - Regeneración de organos
  - Paralisis, diabetes, cancers, y muchos mas

- Time Man of the year  
1933
- 32<sup>nd</sup> President of the  
United States
- 4 periods
- Franklin D. Roosevelt
- Crucial participation in  
WWII
- Singed the Social  
Security Act

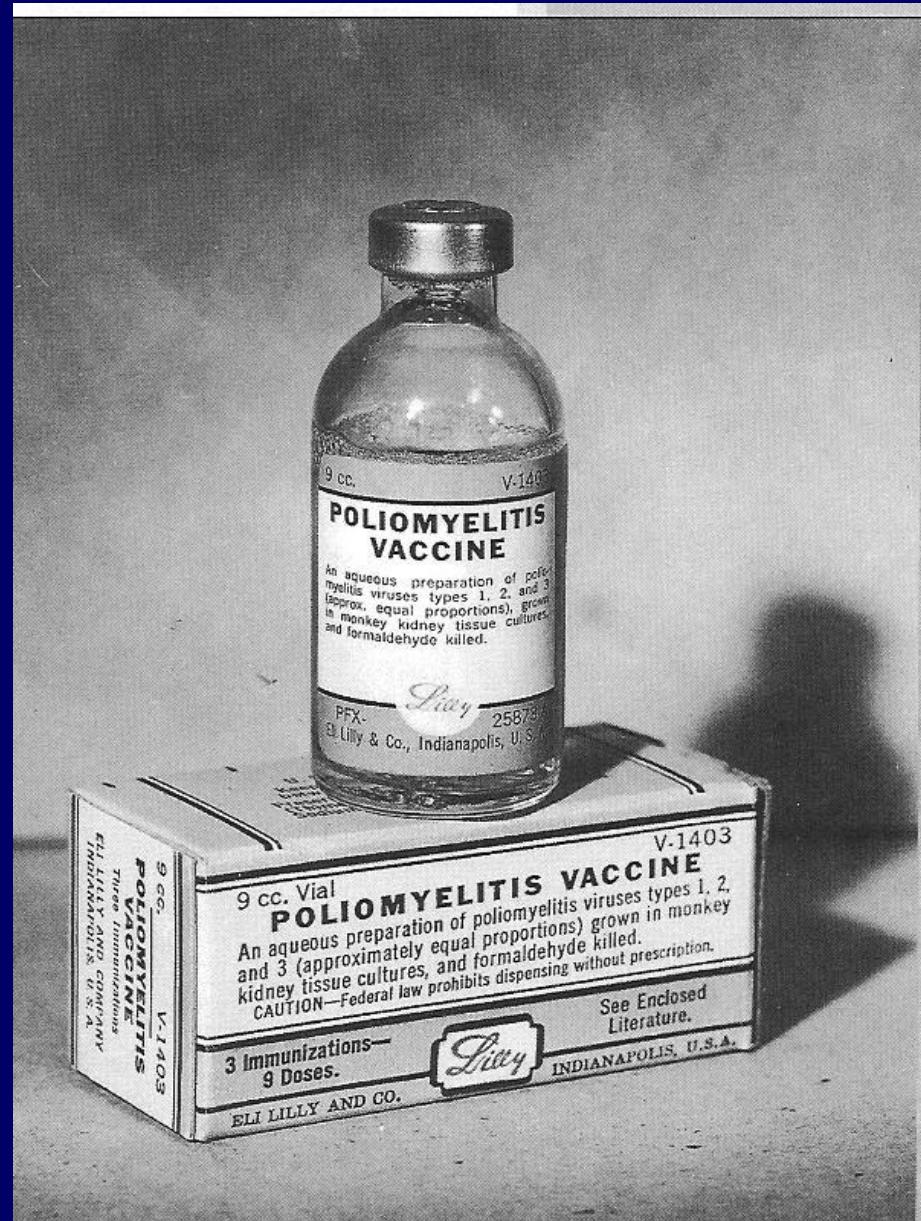
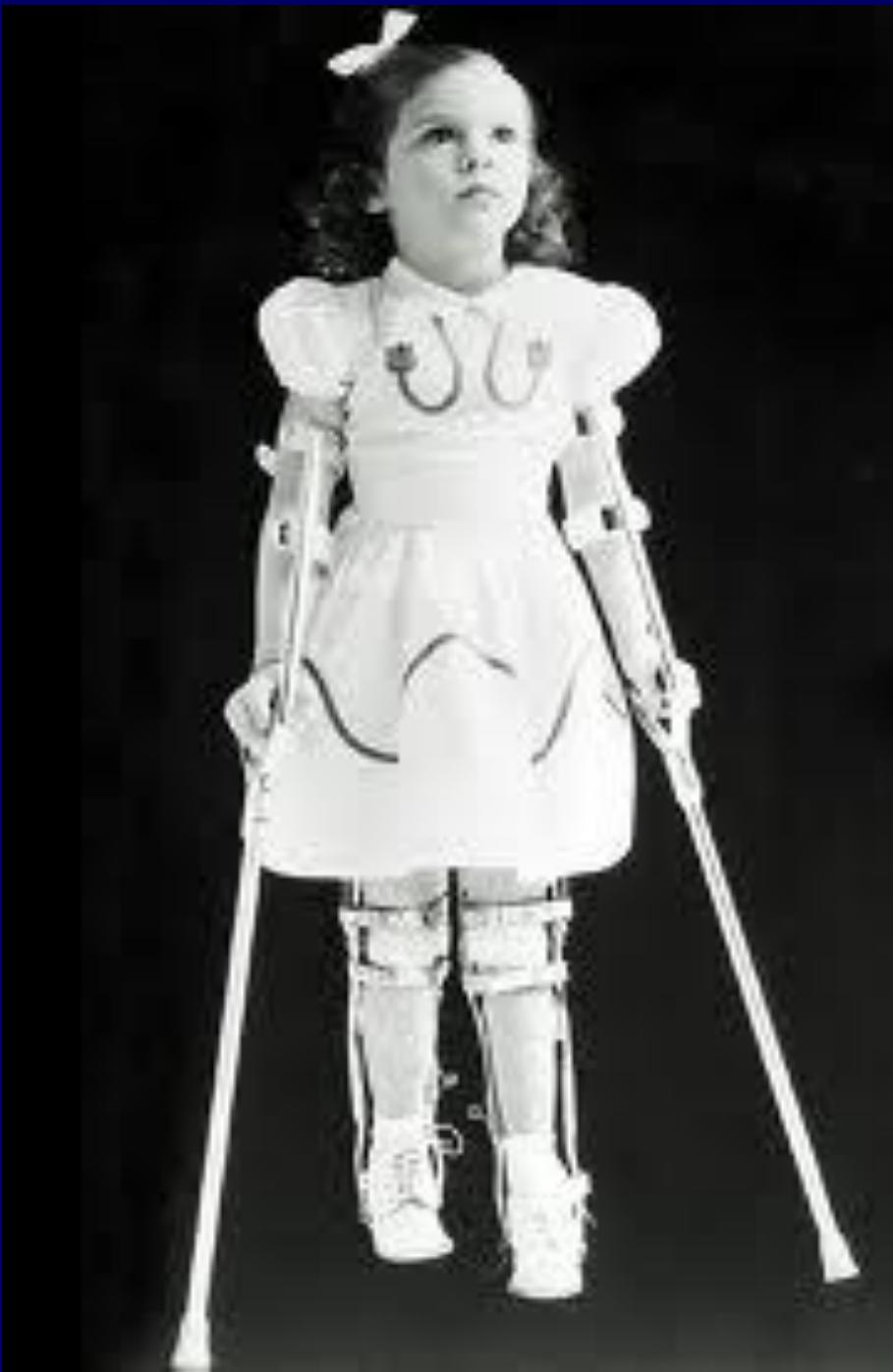




- Diagnosed with polio at age 39
- Guillain–Barré syndrome (GBS)

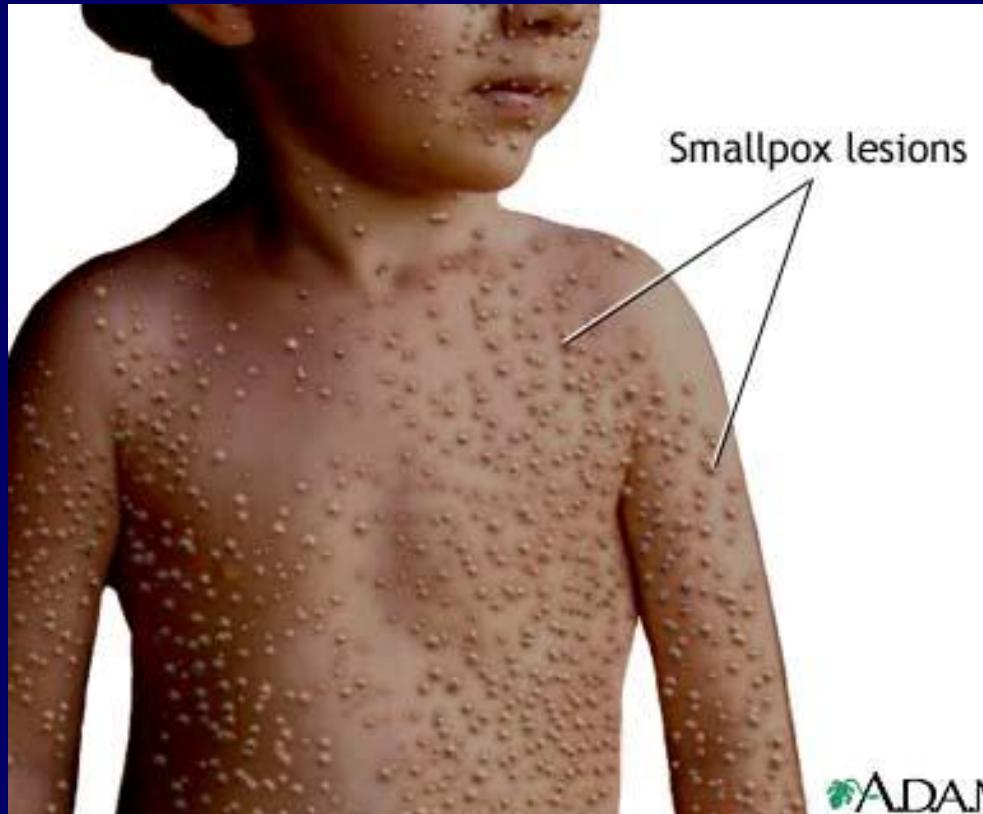
- Polio (enterovirus)

- Polio was one of the most dreaded childhood diseases of the 20th Century in the world
- There were usually about 13,000 to 20,000 cases of paralytic polio reported each year in the US before the introduction of Salk inactivated polio vaccine (IPV) in 1955.
- Polio peaked in 1952 when there were more than 21,000 reported cases.
- The number of cases of polio decreased dramatically following introduction of the vaccine and the development of a national vaccination program.
- In 1965, only 61 cases of paralytic polio were reported compared to 2,525 cases reported just five years earlier in 1960.



- Small Pox (Viruela)

- Orthopoxvirus
- Variola minor
- Variola major
- Estimated that 300-500 million died in the 20<sup>th</sup> Century
- A vaccine was developed

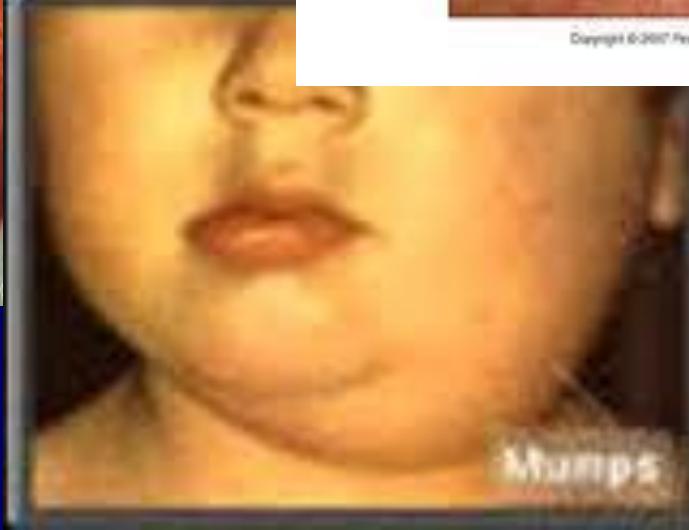


ADAM.



- Vacunación se detuvo en 1970 (US)
- WHO declaro erradicada la viruela (smallpox) en 1979

- Sarampión-Paperas-Rubeola
- Measles-Mumps-Rubella vaccine
  - Virus ARN (RNA)



Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

Figure 21.16



- Jeff a los 5 años y Duke
- Jeff recevio cirugia correctiva de corazón
- Sx se practico 1ro en Duke

- 35 años despues...
- Jeff se caso y fue padre de 3 hijos
- Sin la cirugia, Jeff no hubiera tenido una vida normal
- Despues de la sx, Duke fue a la casa con Jeff
- Duke fue su mascota por 8 años
- Investigación biomedica toca y cambia vidas

# Investigación

- Cancer
- Diabetes
- Obesidad
- Toxicologia
- Problemas auditivos
- Problemas oculares
- Enfermedades de piel
  - Acne, eczantema, rosacea
- Celulas totipotente (stem cells)
- Cirugia
- Presion arterial
- Transplante de organos
- Muchas mas

# Introducción

Este es el primer cuadro de la presentación.

Este es el segundo cuadro de la presentación.

Este es el tercer cuadro de la presentación.

Este es el cuarto cuadro de la presentación.

Este es el quinto cuadro de la presentación.

Este es el sexto cuadro de la presentación.

Este es el séptimo cuadro de la presentación.

Este es el octavo cuadro de la presentación.

Este es el noveno cuadro de la presentación.

Este es el décimo cuadro de la presentación.

Este es el undécimo cuadro de la presentación.

Este es el duodécimo cuadro de la presentación.

Este es el décimotercer cuadro de la presentación.

Este es el décimocuarto cuadro de la presentación.

Se estima que 180 millones de ratas y ratones se produjeron en 1999\*

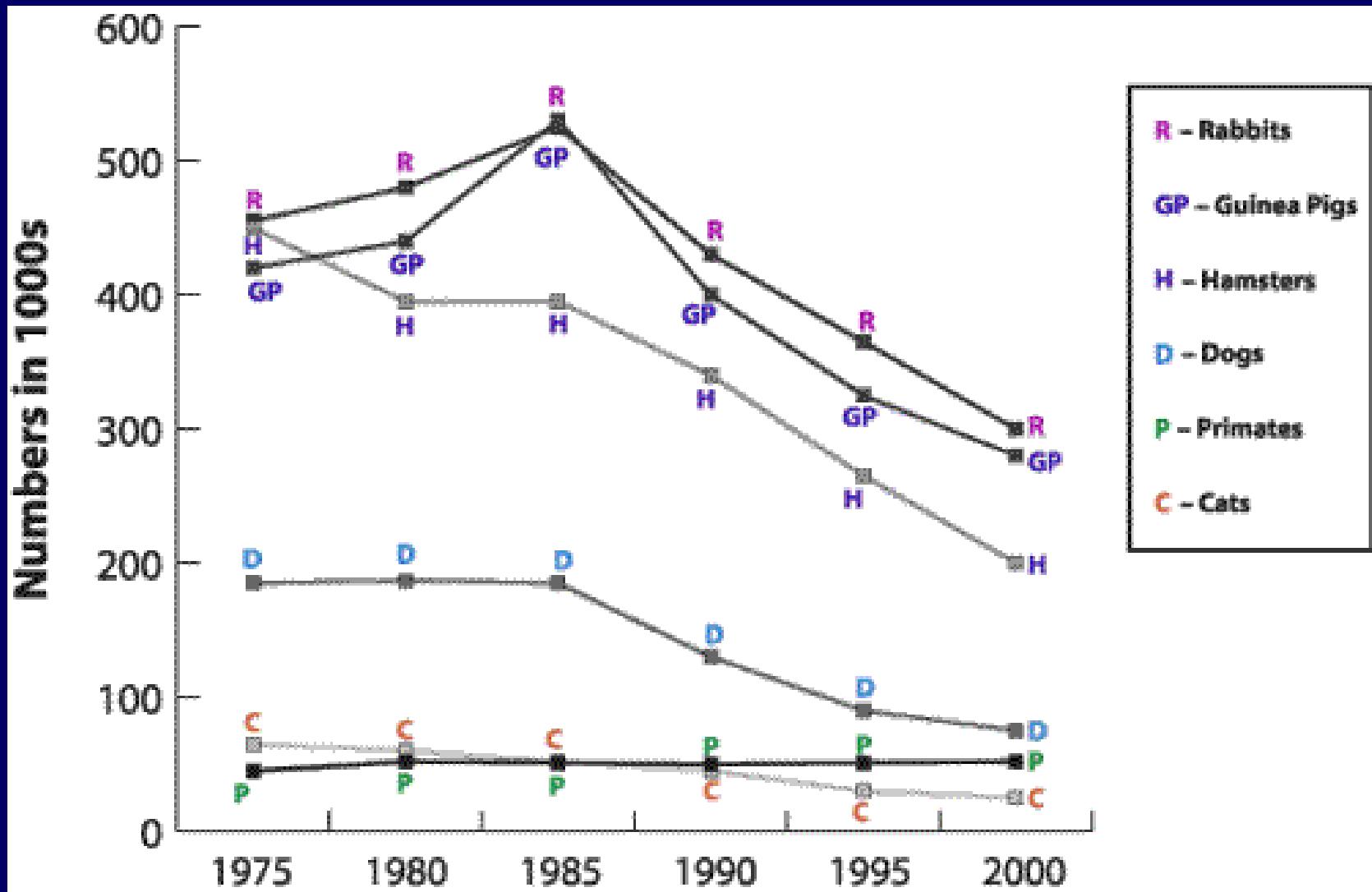
(%)	Millones	Uso
93	167.4	Comida para mascotas y animales de zoologico
2	3.6	Vendidos como mascotas
5	9	Investigación
<b>100</b>	<b>180</b>	

\*The Wall Street Journal 5/13/99; copyrighted by the Dow Jones Interactive Publications Library

# Uso de Animales de Laboratorio en EEUU

- 90-95% de los animales utilizados en investigacion son ROEDORES (~ 9 millones)
  - Center for alternatives to animal testing, John Hopkins University
- 10% otras especies (1 millon)

## Animals Used Annually\*



\*Adapted from Animal Welfare Report, USDA, FY1998

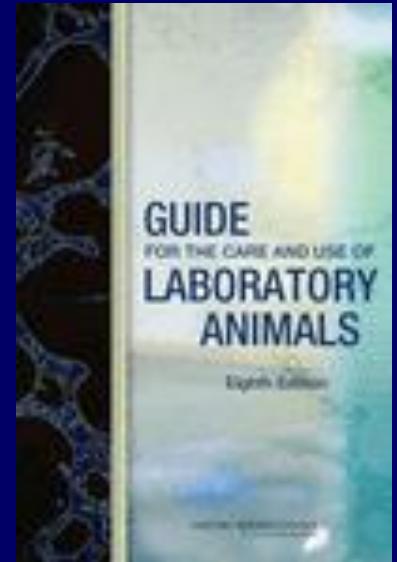
# Reglas y Regulaciones

- USDA Animal Welfare Act
  - Ley de Bienestar Animal
- PHS Policy (NIH)
  - Secretaria de Salud
  - Institution's Assurance
  - Grants



# Rules and Regulations

- The Guide (8<sup>th</sup> ed.) o la Guia
  - The Institute of Laboratory Animal Resources (NIH)
  - Instalaciones (edificio)
  - Espacio (Housing space)
  - Cuidado Veterinario
- Guias del IACUC Institucional
  - Membresia del IACUC
  - Revisión y aprobamiento del protocolo de uso de Animales



# Rules and Regulations

- Regulación voluntaria (Self regulation)
  - Evaluación voluntaria del programa institucional de cuidado animal
- Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC)



# AAALAC Accreditation

- **AAALAC INTERNATIONAL'S ASSESSMENT PROCESS**
  - AAALAC International's Three Primary Standards
  - AAALAC International's Application of Performance Standards
- **ANIMALS INCLUDED IN THE AAALAC INTERNATIONAL ACCREDITED “UNIT”**
  - Animal ownership
  - Invertebrate animals
- **INSTITUTIONAL RESPONSIBILITIES**
  - Allergy prevention
  - Frequency of program review and facility inspection
  - Harm-benefit analysis
  - Nonaffiliated member of the IACUC
  - Post-approval monitoring
  - Program-wide IACUC/OB exceptions
  - Reporting animal welfare concerns
- **ANIMAL ENVIRONMENT, HOUSING AND MANAGEMENT**
  - Surgery in investigator laboratories
  - Non-Pharmaceutical-Grade Compounds
  - Client-owned animals in veterinary colleges

# AAALAC Accreditation

- **VETERINARY MEDICAL CARE**
  - Calibrating anesthetic equipment
  - Aseptic surgery and alcohol as a disinfectant
  - Intraoperative monitoring
  - Rodent surgery record keeping
- **PHYSICAL PLANT**
  - Designing a new facility or renovation
  - Emergency power supply
  - Exposed pipes and ductwork in the animal facility
  - Hospital stops
  - Humidity control
  - Recycled air
  - Vibration detection and suppression
  - Windows in animal rooms
  - MR Scanners and Cryogen Gas Storage
- **ADMINISTRATION**
  - What is AAALAC?
  - How is AAALAC governed?
  - What is the Council on Accreditation?
  - How does someone become a Council member?
- What are ad hoc Consultants?
- How does someone become an ad hoc Consultant?
- How many animal care and use programs are accredited?
- Does AAALAC make its own regulations and policies?
- How extensive is an AAALAC evaluation?
- Are small programs eligible?
- Are agricultural animal programs eligible?
- How much does accreditation cost?
- **THE ACCREDITATION PROCESS**
  - Program Descriptions
  - Accreditation Fees
  - Confidentiality
  - Drop-In Visits
  - "Should" vs. "Must"
- **MAINTAINING ACCREDITATION**
  - Annual Reports
  - Reporting Requirements

# Reglas y Regulaciones

- Directivas de el Comite Institucional Para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (IACUC)
- Procedimientos Operacionales o Standares de el D.M.C, Dep. cuidado animal, Dep. recursos veterinarios, División de Servicios Veterinarios, etc, etc,

# Protocol de Investigación

- Investigador Principal es el/la responsable
  - Porque tiene que usar animales
  - Justificación de el # de animales
  - Procedimientos
    - Muestras de sangre (ex. Volumen)
    - Cirugia
    - Anestesia
    - Analgesia
    - Monitoreo y criterio de euthanasia
    - Metodo de eutanasia (CO<sub>2</sub>, barbituricos, etc)

- Surgical or painful procedure

Ear tags



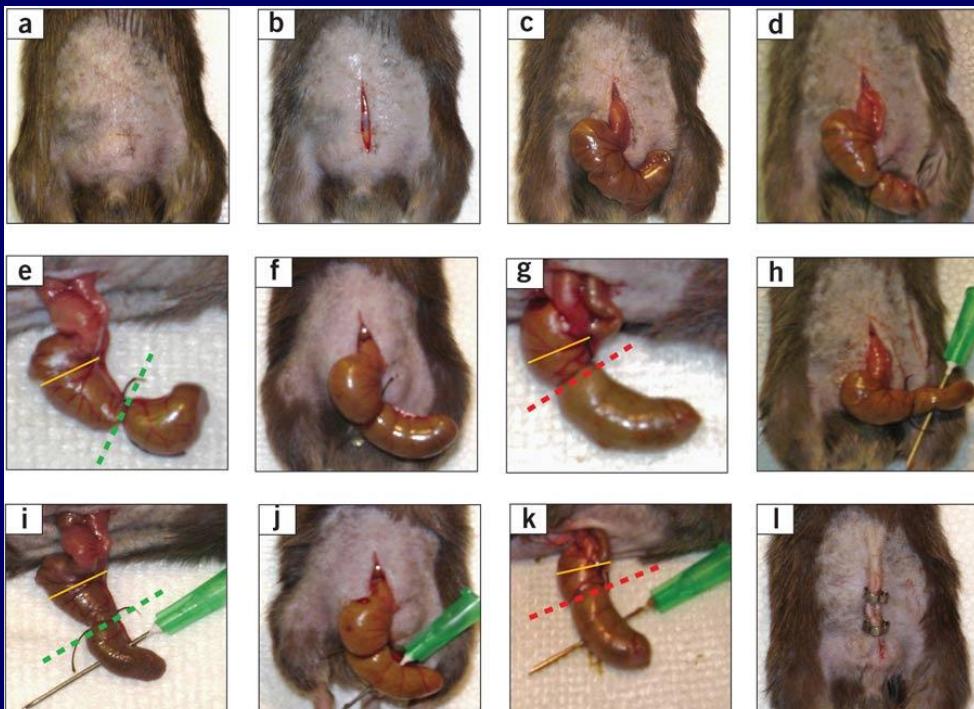
Ear notches



IV injection



- Major procedure  
(opens a body cavity)
- # of animals  
undergoing the procedure



# IACUC

- Minimo 3 miembros
  - Presidente o director del comite
  - Representante de la comunidad
  - Veterinario
- In OHSU (14 miembros)
  - Revisa y aprueba cada protocolo
- Protocolo se revisa anualmente
- Protocol se renova cada 3 años

- The 3 R's
  - REPLACEMENT (reemplazo)
    - Phylogenetic
    - Culture or computer model
  - REDUCTION (reducción)
    - Animal sharing
    - Experimental design
  - REFINEMENT (refinamiento)
    - Improve post surgical care
    - Developing better techniques



# Regulaciones y Tecnología

# Ambiente

- Temperatura ambiental: 68-82 °F (20-28 °C)
- Luz: 12 hr/12 hr
- Intensidad: 325 lux a 1 mt de altura
- Cambios de aire: 10-15/hr
- Cama: desinfectada via autoclave
- Agua: ad libitum (botella or automatica)
- Cambio de caja:
  - Sistema estatico: 2-3 veces/semana
  - Sistema ventialdo: cada 2 semanas

# Dietas

Harlan Laboratories



**harlan™**  
Helping you  
do research better

Teklad Irradiated Standard Diets

# Cajas Estaticas



# Cajas Ventiladas



# Cajas Ventiladas



# Colonias SPF

## Ratones

- SEND - Sendai Virus
- PVM- Pneumonia Virus of Mice
- MHV- Mouse Hepatitis Virus
- MVM - Minute Virus of Mice
- TMEV - Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus
- REO - Reovirus
- MPUL - Mycoplasma Pulmonis
- EDIM - Epizootic Diarrhea of Infant Mice Virus
- MNV – Mouse Norovirus
- Parasitos (acaros y nematodos)
- LCMV -

## Ratas

- SEND - Sendai Virus
- PVM- Pneumonia Virus of Mice
- SDA/RCV- Rat Coronavirus / Sialodacryoadentitis Virus
- KRV - Kilham Rat Virus
- H-1 - Toolan's H-1 Virus
- REO - Reovirus
- MPUL - Mycoplasma Pulmonis
- RPV - Rat Parvovirus
- RMV - Rat Minute Virus
- CARB - Cilia-Associated Respiratory Bacillus
- Parasitos (acaros y nematodos)

# Programa Murino de Muestreo Epidemiologico

- Sentinelas (2 ratones/70 cajas)
- Transferencia de Cama (5 ml) al tiempo de cambio (1-2 semanas)
- PCR – virus, bacterias, ectoparasitos (3x)
- Serologia (ELISA y IFA) y ectoparasitos (1x)
- Necropsia (6 meses)















PLEASE CLEAN BEFORE & AFTER USE





# Porque Tanta complicación?

- Animales de alta calidad biologica
- Resultados de alta calidad
- Resultados reproducibles
- Resolver problemas biomedicos  
(enfermedades)



---

# Good Animal Care and Good Science Go Hand in Hand



---

A program sponsored by the  
NIH Animal Research Committee  
406-5424

# Diabetes

- “*In the US, the American Diabetes Association (ADA) has estimated that the total cost of diabetes in 2002 was \$132 billion, reflecting the projected increase in prevalence of the condition, total costs are predicted to rise further, to reach \$156 billion in 2010 and \$192 billion in 2020”.* Smyth and Heron, 2006.
- Ademas de el costo humano!!!!



 **SWEET'N LOW**  
© PARVE  
Pat. No. 3,625,711

**ZERO CALORIE SWEETENER**  
A blend of nutritive and non-nutritive sweeteners

**INGREDIENTS:** Nutritive Dextrose, 3.6% Soluble Saccharin (36 mg per packet), Cream of Tartar, Calcium Silicate (an anti-caking agent).

**Nutrition Facts:** Serv. Size: 1 packet, Servings: 1, Amount Per Serving: Calories 0, Total Fat 0g (0% DV), Sat. Fat 0g (0% DV), Trans Fat 0g, Sodium 0mg (0% DV), Total Carb. Less than 1g (0% DV), Sugars Less than 1g, Protein 0g. Percent Daily Values (DV) are based on a 2,000 calorie diet.

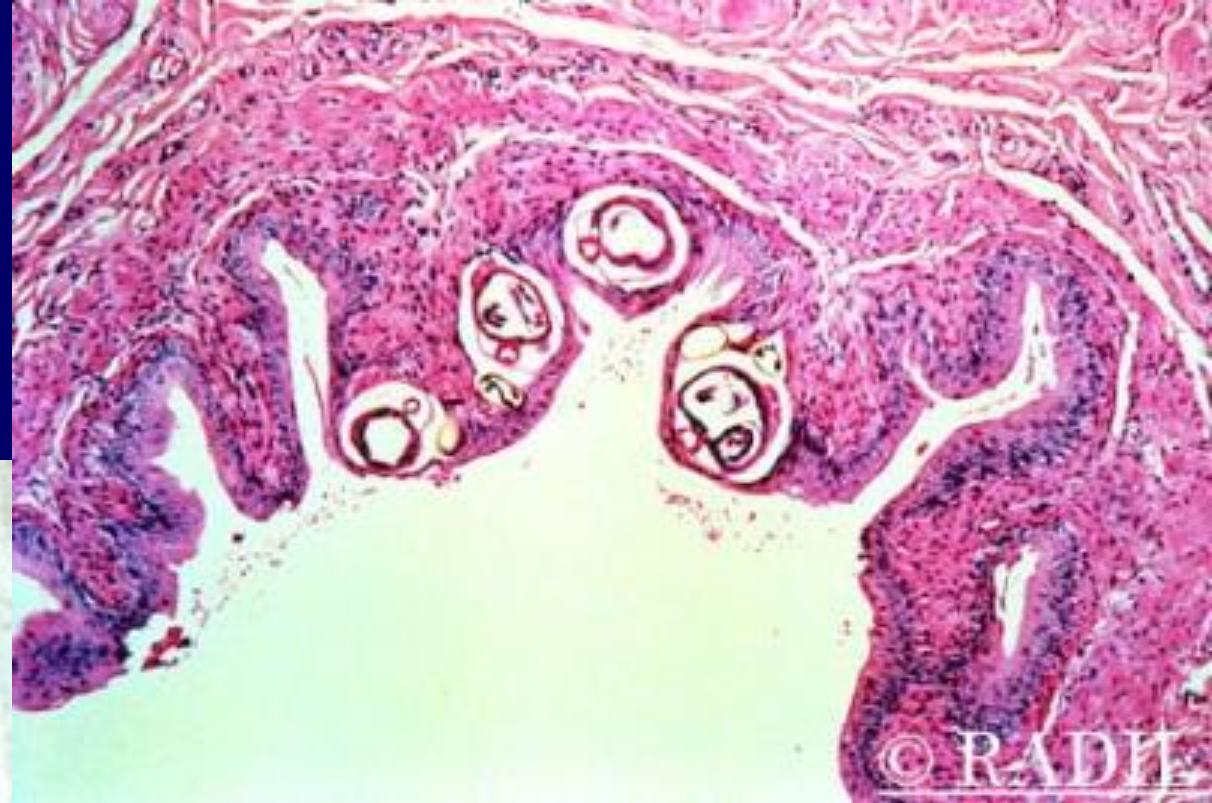
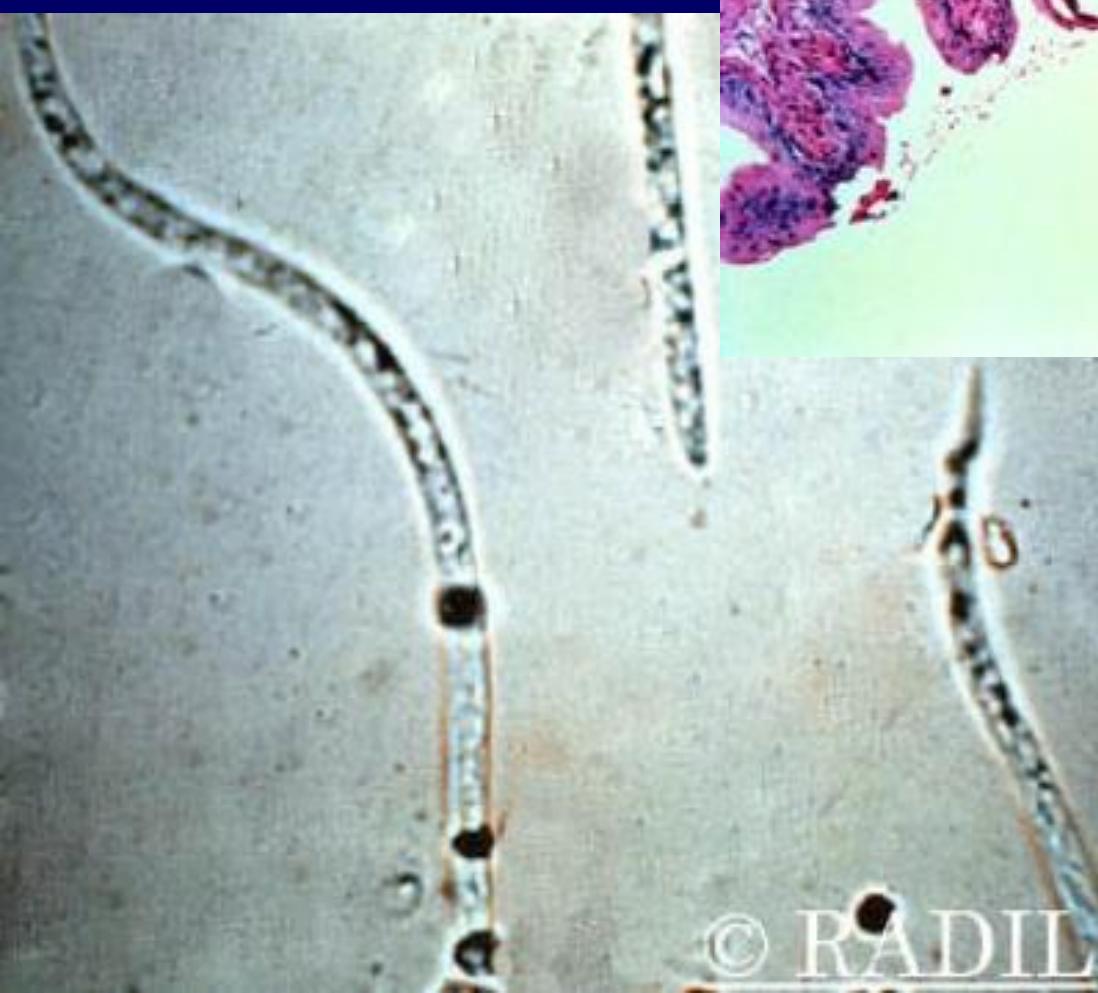
Information: 1 packet contains the sweetness of 2 teaspoons of sugar.  
Cumberland Packing Corp., Brooklyn, NY 11205      **NET WT. 0.035 OZ. (1g)**  
Go to [sweetnlow.com](http://sweetnlow.com) for great recipe ideas and premium offers.

# Sacarina (Saccharine, Sweet'n low)

- Substituto de azucar
- Asociado con producción de cancer
- Hay cierto recelo al sobre rosado
- Sin embargo, no se pudo reproducir los canceres de vejiga urinaria y el mecanismo no es relevante en humanos

# Sacarina (Saccharine, Sweet'n low)

- Adicionalmente,
- Ratas usadas eran positivas a *Trichosomoides crassicauda*
- Nematode de la vejiga urinaria



# The Jackson Laboratories

## - JAX® Mice

- 4,500 + cepas (strains)
- 2.7 millones de ratones distribuidos anualmente
- Alta calidad genetica y sanidad animal
- Common inbred strains
  - (C57BL/6J, BALB/cJ, DBA/2J) support development/collection of specialty strains and other valuable

# Tecnologías Aplicadas a la Investigación

# Inyección de esperma intracitoplasmática (ICSI)



# Tecnologías Reproductivas

- Ratones trangénicos (transgenics)
  - Adición de un gene de interes
  - Adición de marcadores (green fluorescent protein - GFP)
- Knock-outs
  - Remoción de un gene de interes

# Diagnostico

- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay):
  - Antigenos de una muestra se adieren a una superficie (Plato de 96 fosos). Luego un anticuerpo específico se aplica y se une al antígeno de la muestra. Este anticuerpo está unido (link) a una enzima, y en la etapa final se añade el sustrato, y la reacción entre enzima y sustrato produce un señal detectable (cambio de color y absorción de luz).

- IFA (Indirect Fluorescent Antibody test)
  - Utiliza tinciones fluorescentes para identificar la presencia de anticuerpos unidos/conjugados a un antígeno específico.
- PCR
  - ADN (DNA), RT-PCR
- Northern Blot
  - ARN, permite determinar peso molecular, y cuantificar la cantidad de ARN (mas o menos expresión).
- Western Blot
  - proteínas específicas

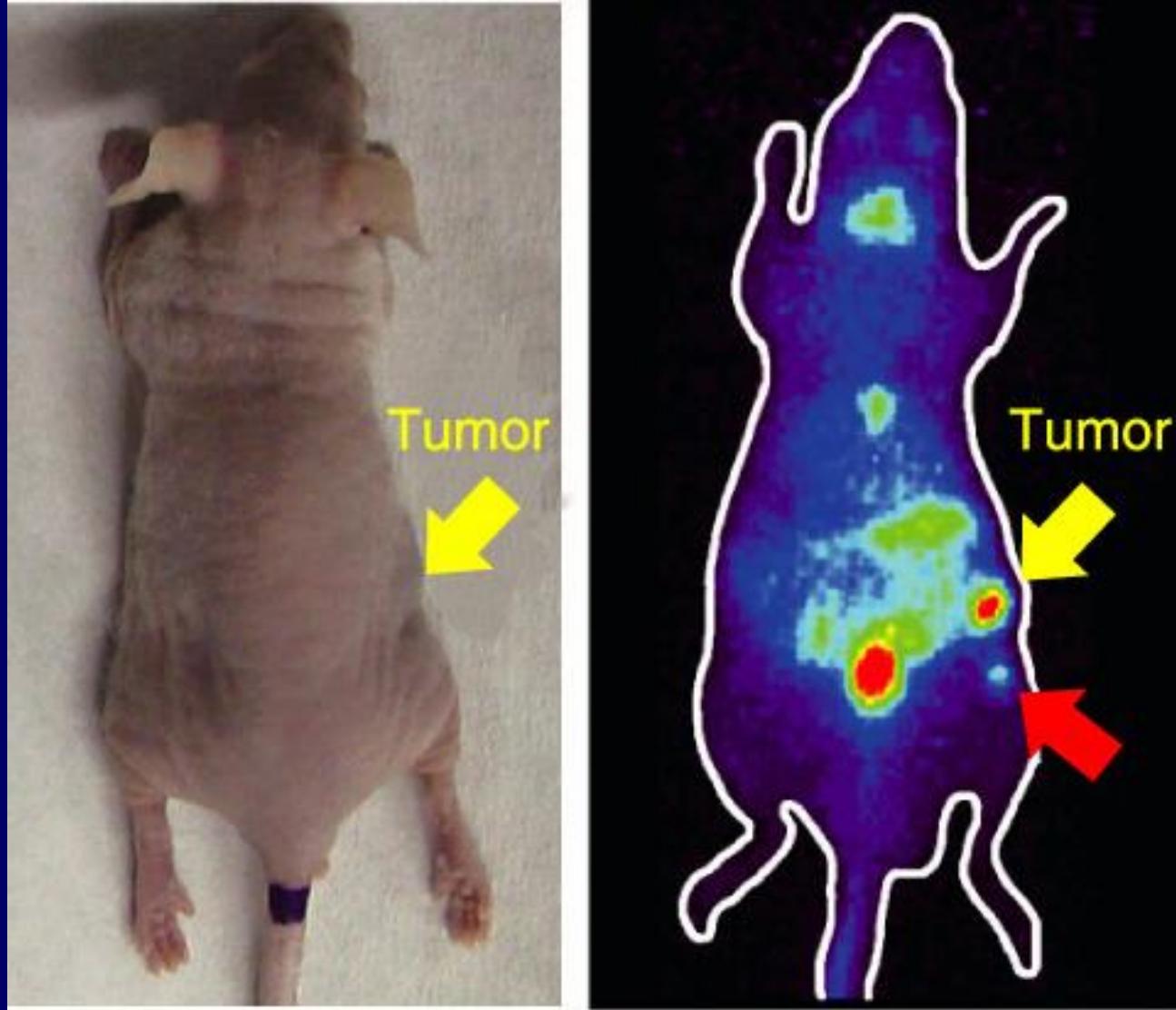
# Tecnologias de Imagenes

- Rayos X
  - radiografias (produce radiación)
- A positron emission tomography (PET)
  - scan is an imaging test that uses a radioactive substance called a tracer to look for disease in the body.
  - A PET scan shows how organs and tissues are working

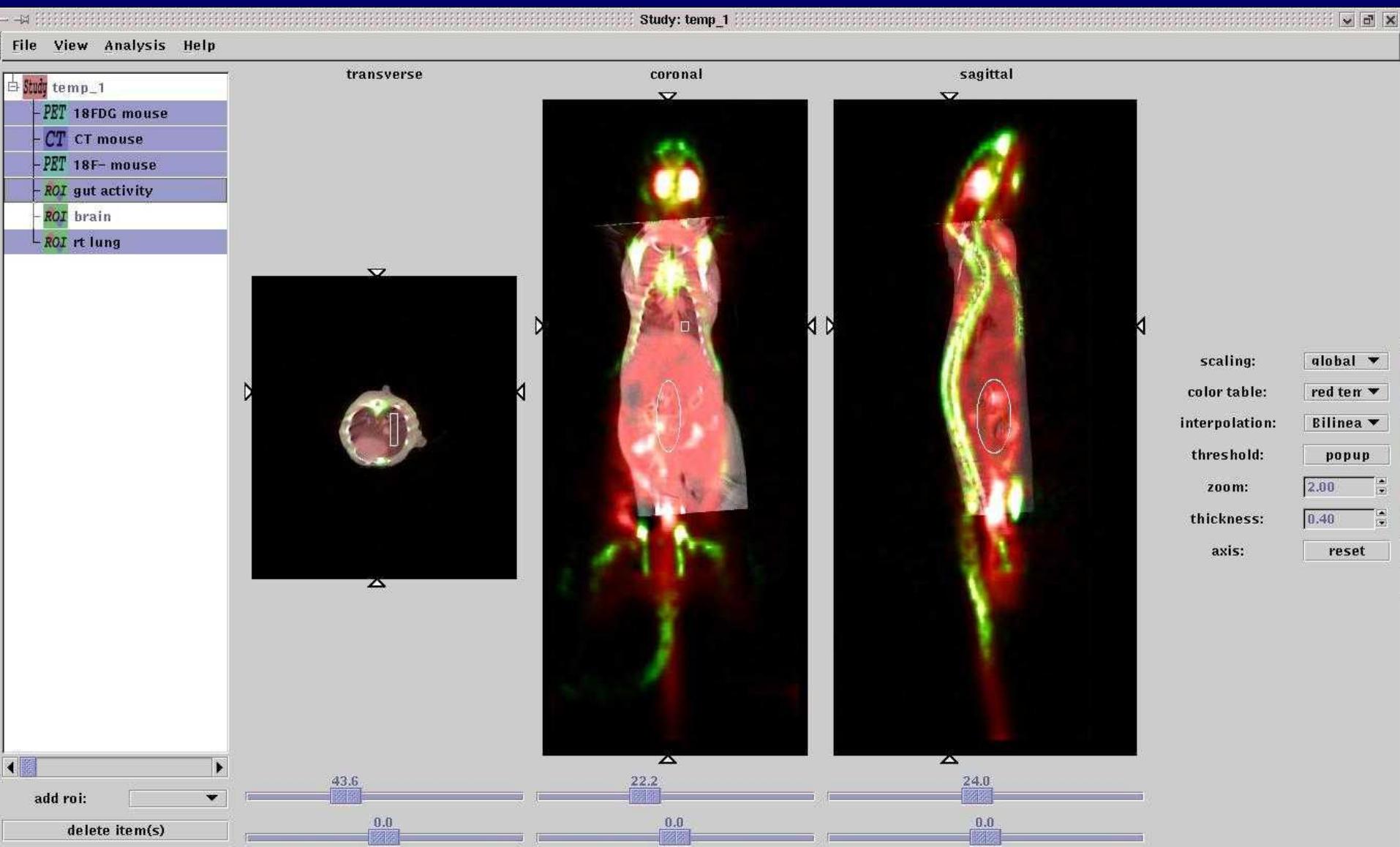
The Bioscan NanoPET/CT provides a high-precision gantry for exact alignment of PET/CT data. The gantry bore opening is 16cm and accommodates imaging of mice ...



## Pet Scan



- Shows a session containing a superimposed FDG PET scan (red), CT scan (black/white), and F- PET scan (green)

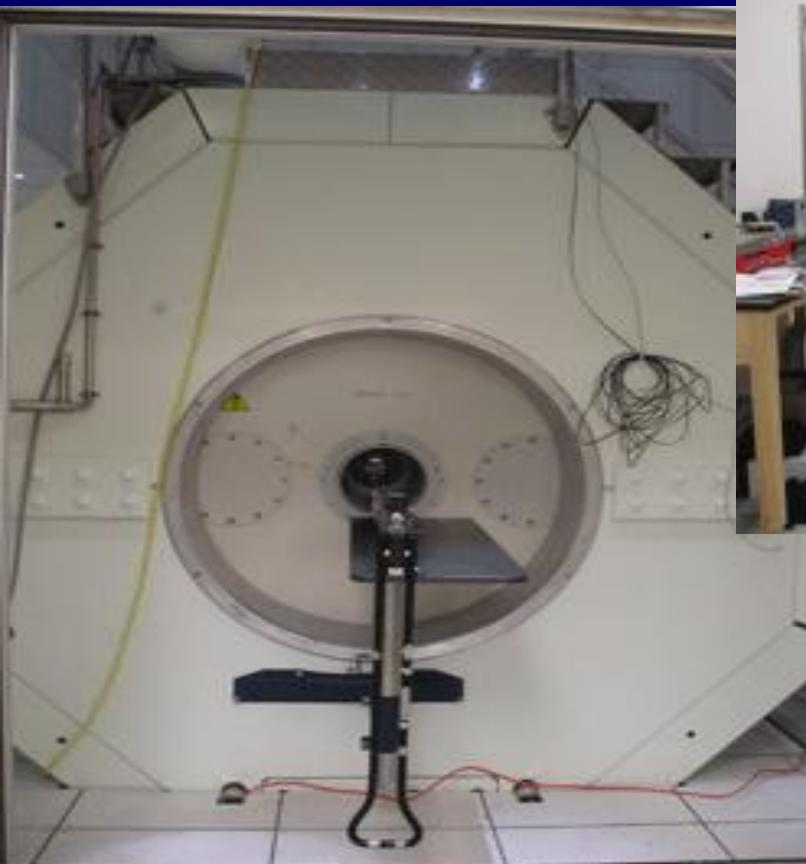


- CT-Scan
  - Tomografia computarizada. Permite la producción de imágenes 2D y 3D utilizando radiografías en secuencia (produce radiación)
- DEXA scan
  - Tambien llamado Dual-Energy X-ray Absorptiometry. Esta modalidad utiliza rayos X que se usan para determiner densidad de tejidos, entre estos huesos, contenido graso y otros.

- Ultrasonido
  - Utiliza ondas de alta frecuencia de sonido (arriba de el limite superior audible en humanos) de para producir imagenes. Una computadora recive las el sonido reflejado por los diferentes tejidos para producir una imagen. A diferencia de rayos X y tomografia computarizada, no utilize radiación ionizante

- MRI
  - Imagenes de resonancia magnetica. Esta tecnica utilize campo magneticos y ondas de radio para crear imagens de organos y tejidos. MRI utiliza un imán de gran proporción (magnets) para producir un campo magnetic que re-alineas los atomos de hydrogeno en el cuerpo y las ondas de radio hace que los atomos de hidrogeno alineados produzcan señales que son utilizadas para producir una imagen. Las imagenes se producen en secciones y pueden ser utilizadas para producir imagenes 3D

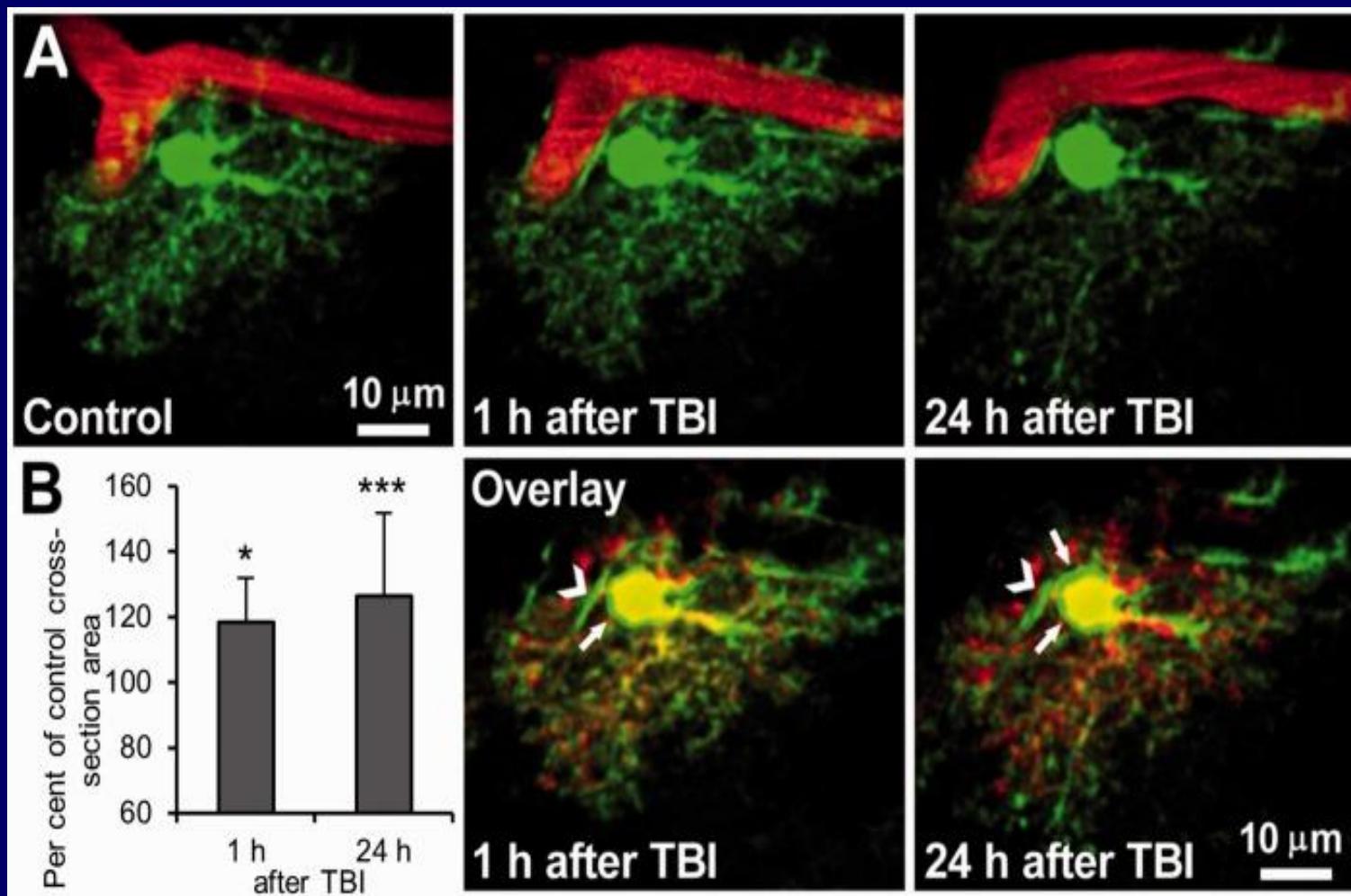
The Bruker 12T instrument situado en el Biomedical Research Building en Oregon Health & Science University. Este MRI es uno de los tres 12T MRI en el mundo, y su peso es 12 toneladas. Panel A, muestra el MRI 12T de 11.75 Tesla. Panel B, muestra la vista del MRI desde el cuarto de control. Panel C, muestra el area donde se anesthesia a los roedores (ratón y ratas) para poder tomar las imágenes.



- LASER: (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation)
  - Two-photon laser scanning microscopy:
    - provee la capacidad de producir imagenes de una celula in situ. Por ejemplo, en Brain 2013: 136; 1446–1461 (Evolution of neuronal and astroglial disruption in the peri-contusional cortex of mice revealed by in vivo two-photon imaging), Sword et al., utilizaron esta modalidad de imagenes para obsevar la misma celula en el cerebro (astrocito) de un raton transgenico antes y despues de una lesión cerebral traumática.

# Zeiss LSM 510 NLO META multiphoton system mounted on the motorized upright Axioscope 2FS microscope





Inflamación persistente en celulas gliales (astrocitos) 24 horas despues de una lesion traumática cerebral, utilizando un sistema multifoton Zeiss LSM 510 NLO META montado en un sistema motorizado Axioscope 2FS microscope.

# Otras Tecnologias

- Microbiome
  - describe y estudia la influencia de los microorganismos que habitan en los cuerpos. Por ejemplo, el efecto de la flora intestinal y su influencia en susceptibilidad a enfermedades, toxicos, y otros.

# Otras Tecnologias

- Proteomics
  - Se refiere al estudio de proteinas producidas por un gen, incluyendo modificaciones resultantes a un set de proteinas producidas por un organismo o sistema celular. La aplicación de esta tecnologia se refiere a cambio de proteinas (cuantificación, de estructura, etc) resultante a la presencia de un estres, proceso de enfermedad, toxicidad, etc

# Otras Tecnologias

- Genomics
  - Es el estudio de los genes o productos de genes (ej. Proteinas) en una persona o organismo.
    - Structural Genomics: estudia la estructura tridimensional de una protein, ya que la estructura de una proteina determina su function.
    - Functional Genomics: estudia la dinamica de los procesos celulares como transcripción, translación, y productos de genes y sus interacciones.

# Conclusión

- Quedan muchos problemas medicos y enfermedades por resolver
- El uso de modelos animals is vital
- La regulación de su uso es tambien vital
- Ciencia de alta calidad, requiere cuidado animal de alta calidad

Eso es Todo por Hoy!!!

I'll be back  
(Volvere)

# 1996, 2006 y 2008 Campeones Nacionales y de la Conferencia del Sureste (SEC)



2013 por la calle  
de la amargura!

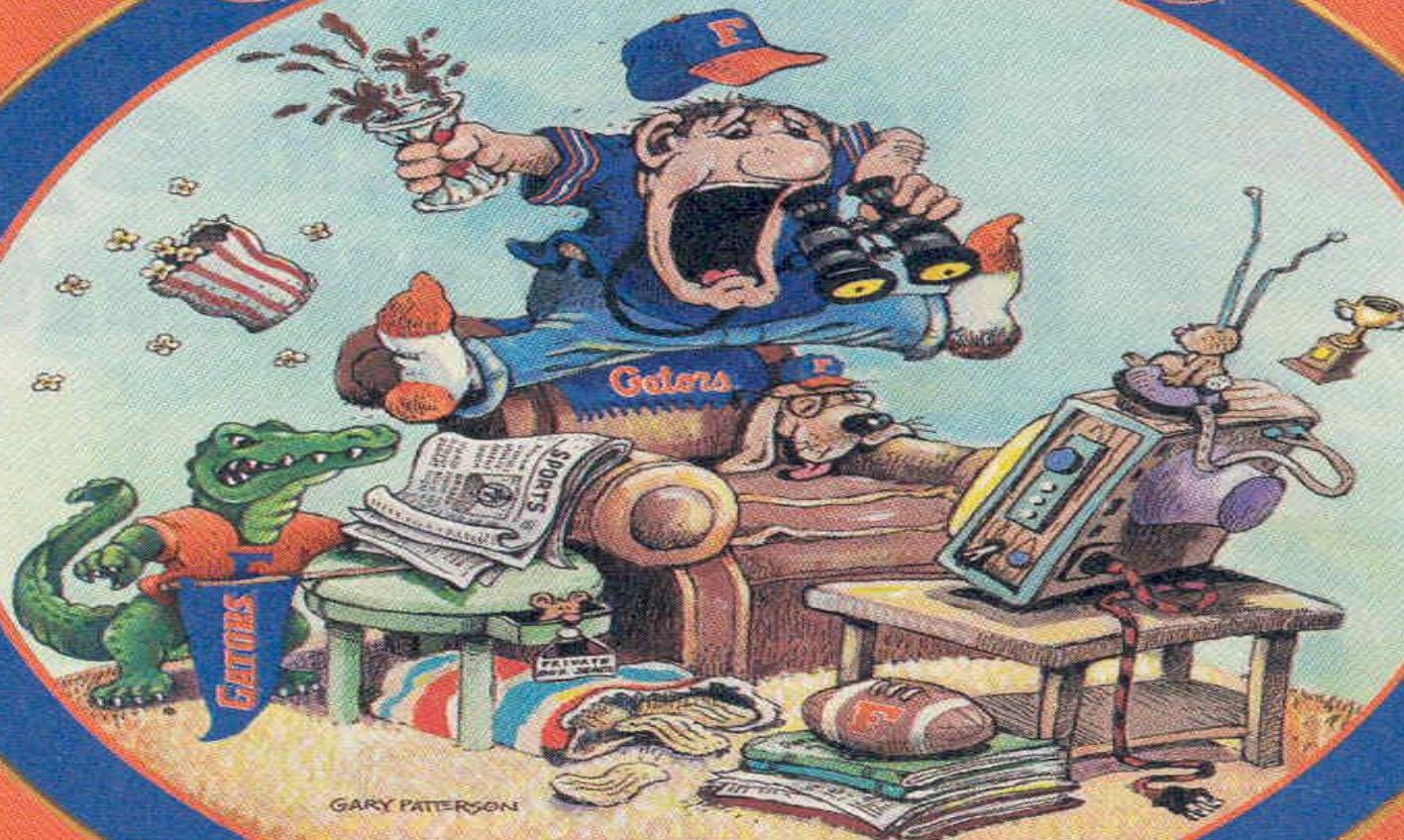
Pero siempre  
fiel al equipo,  
asi que...

Go  
Gators!!

Ademas, siempre esta el proximo año!!!

**TOUCHDOWN!**

**FLORIDA**



*the Danbury Mint*

# FLORIDA™ FAN

by GARY PATTERSON



© MBI