

1.1. Título do projeto de utilização de animais:

***Estudo dos processos fisiopatológicos do desenvolvimento de dor crónica e do potencial analgésico de novos compostos em culturas primárias de neurónios sensoriais e em modelos animais de dor neuropática e inflamatória***

2. Nome do investigador responsável pela realização do projeto:

Pedro Afonso Baltazar dos Santos Lima

**Modelo de Resumo não técnico de projeto experimental**

<b>Título do projeto</b>	<b><i>Estudo dos processos fisiopatológicos do desenvolvimento de dor crónica e do potencial analgésico de novos compostos em culturas primárias de neurónios sensoriais e em modelos animais de dor neuropática e inflamatória</i></b>		
<b>Duração do projeto</b>	5 anos (18 de Junho 2018 a 17 de Junho de 2023)		
<b>Palavras-chave (máx. 5)</b>	Dor crónica; analgesia; compostos marinhos; fisiopatologia da dor; neurónios DRG		
<b>Fim/objetivo do projeto</b>  (de acordo com Artº 5º) <sup>(1)</sup>	Investigação fundamental	<b>Sim</b>	
	Investigação translacional ou aplicada	<b>Sim</b>	
	Uso regulamentar e produção de rotina		<b>Não</b>
	Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais	<b>Sim</b>	
	Investigação destinada à conservação das espécies;		<b>Não</b>
	Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais		<b>Não</b>
	Inquéritos no domínio da medicina legal		<b>Não</b>
	Manutenção de colónias de animais geneticamente alterados <sup>(2)</sup>		<b>Não</b>
<b>Descreva os Objetivos do Projeto</b> (ex., incógnitas científicas ou necessidades científicas/clínicas a serem abordadas, etc)	<p><i>A Dor Crónica é uma doença que afecta mais de 20% da população Humana e, contra a qual, não existe tratamento adequado, principalmente no contexto da Dor Neuropática, mas também da Dor Inflamatória.</i></p> <p><i>Os neurónios do gânglio da raiz dorsal (DRG, do inglês 'Dorsal Root Ganglia'; ou também 'pain-sensing neurons'), e também para a neuralgia do trigémio os neurónios do gânglio trigeminal, são o modelo experimental principal nos estudos sobre a fisiopatologia da</i></p>		

	<p>dor e são protagonistas primordiais na Indústria farmacêutica dedicada à investigação e desenvolvimento de novos analgésicos. Pretende-se, assim:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudar os canais de Potássio e Sódio directamente implicadas no processo e estabelecimento da Dor Crónica (Neuropática e Inflamatória) em culturas primárias de neurónios DRG obtidas a partir de preparações ex-vivo de ratos Wistar (modelos de dor crónica e controlos), a fim de averiguar de que forma, tanto a expressão destes canais como o seu funcionamento biofísico e farmacológico, estão alterados nos processos de dor, acrescentando deste modo conhecimento científico à patofisiologia da dor crónica;</li> <li>- Verificar se extractos marinhos de compostos poderão ter implicação na modulação da dor ao actuar nestes mesmos canais iónicos, podendo constituir, desta forma, uma nova classe de fármacos para a terapia da dor;</li> <li>- Determinar a eficácia e a toxicidade destas moléculas marinhas identificadas em culturas primárias de neurónios DRG e nos modelos animais previamente estabelecidos in vivo;</li> <li>- Pesquisar métodos alternativos à experimentação com animais através do estabelecimento de culturas celulares simples de neurónios DRGs embrionicos e em câmaras microfluidicas (MFC), nomeadamente através do desenvolvimento de uma câmara MFC desenhada para a realização de experiências de electrofisiologia e de imagem em tempo real;</li> <li>- Validar novos alvos terapêuticos (canais de Sódio, de Cálcio e de Potássio, como por exemplo NaV1.8, NaV1.7, CaV3.2, Kv1.4 e Kv1.3) para o tratamento da dor crónica e estudo da sua regulação ao nível somático e axonal (através das câmaras MFC), tanto com métodos de electrofisiologia como com métodos bioquímicos e moleculares.</li> </ul>
<p>Quais são os potenciais benefícios que possam derivar deste projeto (como poderia a ciência avançar ou os seres humanos ou outros animais poderiam beneficiar com o projeto)?</p>	<p>Os principais benefícios que provavelmente irão decorrer deste projecto são a validação de alvos terapêuticos para o tratamento da dor crónica, como a dor neuropática diabética e trigeminal e a decorrente de lesão nervosa e a dor inflamatória, como a da artrite e osteoartrite, patologias dolorosas que até hoje não têm uma solução analgésica eficaz na maioria dos casos. Mais ainda, e neste sentido, é perspectivada a descoberta de uma nova classe de fármacos de origem marinha, que em experiências-piloto demonstraram modular canais iónicos envolvidos na Dor. Por último, com o estabelecimento de culturas de células primárias alternativas, como nas câmaras microfluidicas (MFC), pretende-se refinar, substituir e reduzir o número de animais a utilizar neste tipo de modelos animais.</p>
<p>Que espécies animais e números aproximados de animais serão utilizados?</p>	<p><i>Ratus norvegicus</i> e <i>mus musculus</i>.</p> <p>288 Animais adultos ratos Wistar total</p>
<p>No contexto do que é proposto fazer-se aos animais, quais são os efeitos adversos esperados e o grau provável/esperado de severidade? O que acontecerá aos animais no final da realização do projeto?</p>	<p>Grau Moderado a Severo (severidade cumulativa) e Grau Severo (severidade prospectiva) para modelo de dor neuropática diabética-STZ.</p> <p>Grau Moderado a Severo (severidade cumulativa) e Grau Severo (severidade prospectiva) para modelo de dor neuropática induzida por quimioterapia (CIPN).</p> <p>Grau Moderado a Severo (severidades cumulativas e propectiva) para modelo de dor inflamatória (monoartrite do joelho-CFA).</p>

	<p>Grau Moderado a Severo (severidade cumulativa) e Grau Severo (severidade prospectiva) para modelo de dor neuropática-trauma (CCI).</p> <p>No final do projecto os animais serão eutanasiados e amostras biológicas dos mesmos serão colectadas para estudos de electrofisiologia e de bioquímica.</p>
<p><b>Aplicação dos 3Rs</b></p>	
<p><b>1.Replacement (Substituição)</b>  Refira a razão por que precisa utilizar animais e por que não pode usar alternativas não-animais</p>	<p>Estudos já realizados por nós demonstram uma forte relação da insulina com o cérebro linha celular N1E-115, mas não é possível extrapolar para o que passa em termos de condicionamento metabólico sem ter acesso ao animal, ou seja, a neurónios de animais que padecem de distúrbio metabólico, como a diabetes, e sobretudo de neuropatia diabética. Mais ainda, esta linha celular, em como a maioria das linhas celulares existentes, provém de neurónios do Sistema Nervoso Central (SNC) e neste projecto pretende-se estudar agora neurónios sensoriais aferentes, como os DRGs, que fazem parte do Sistema Nervoso Periférico (SNP), tendo características muito diferentes. Existem poucas linhas celulares disponíveis derivadas deste tipo de neurónios (DRG) – as mais utilizadas até hoje são F-11 e ND7/23 (linhas celulares híbridoma de DRG de ratinho). Um estudo recente demonstrou que efectivamente estas linhas celulares não conseguiram mimetizar o que é encontrado in vivo/ex vivo no animal – um dos canais iónicos mais importantes expressos nos DRGs in vivo é o TRPV1 que não se encontra presente nestas células, tornando-as algo inviáveis para prosseguir com os objectivos do estudo da dor e da descoberta de novos analgésicos. Recentemente surgiu outra derivada de neurónios DRG de rato, MED17.11, com resultados mais promissores, em que o canal TRPV1 já se encontra com expressão mantida, mas ainda assim não é possível estudar o que acontece em termos de processamento axonal; por isso neste projecto é objectivo o desenvolvimento de um modelo em câmaras microfluídicas-MFC in vitro mais integrador e que já mostrou resultados preliminares mais promissores. Porém, mais uma vez, não é possível mimetizar ainda na íntegra a condição de neuropatia dolorosa, pelo que não é possível a total substituição do modelo animal.</p>
<p><b>2.Reduction (Redução)</b>  Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais</p>	<p>Prevê-se, que, por ano, sejam utilizados 72 animais Wistar, durante os primeiros 4 anos de projecto: a) 24 ratos para o estudo do modelo de lesão nervosa-neuropatia por trauma: constrição crónica do nervo ciático (CCI) – 6 ratos CCI e 6 ratos naive (controles), fêmeas, para estudos de electrofisiologia e proteómica; 6 ratos CCI e 6 ratos naive (controles), fêmeas, para estudos de eficácia analgésica; b) 24 ratos para o estudo do modelo dor inflamatória: monoartrite do joelho induzida por CFA (CFA) – 6 ratos CFA e 6 ratos naive (controles), machos, para estudos de electrofisiologia e proteómica; 6 ratos CFA e 6 ratos naive (controles), machos, para estudos de eficácia analgésica; c) 12 ratos para o estudo do modelo neuropatia diabética: diabetes I induzida por STZ (STZ) – 6 ratos STZ e 6 ratos naive (controles), fêmeas, para estudos de electrofisiologia e proteómica; e d) 12 ratos para o estudo do modelo neuropatia periférica associada à quimioterapia (induzida por paclitaxel) – CIPN – 6 ratos CIPN e 6 ratos naive (controles), fêmeas, para estudos de electrofisiologia e proteómica; mantendo o protocolo experimental, totalizando para o projecto inteiro 288 animais Wistar.</p> <p>Estamos já a reduzir os animais a gupos de n=6, ao invés de n=9 (número dado estatisticamente para uma significância 0.1 e poder estatístico 0.90) para cada técnica experimental, assumindo uma</p>

	<p>distribuição normal, com técnicas de análise estatística melhorada e com base nos resultados que iremos ter nos primeiros estudos piloto. Mais ainda, algumas das experiências de proteómica (ex: isolamento da fracção de proteína totais em conjunto com proteínas membranares de diferentes amostras do mesmo animal) realizadas nos anos 1, 2 e 3 do projecto, terão amostras partilhadas para as diferentes técnicas, bem como algumas experiências de electrofisiologia (ex: voltage-clamp em neurónios isolados e current-clamp em nervos), sendo objectivo de utilizar estas amostras para validação do alvo terapêutico a nível molecular e farmacológico.</p> <p>Para o estabelecimento das MFCs, serão utilizados neurónios DRGs derivados de embriões E16-E18, numa primeira fase de ratinhos <i>Mus musculus</i> (BL6/C57) e numa segunda fase de ratos <i>Rattus norvegicus</i> Wistar, pois até ao presente momento só foram estabelecidas culturas deste género derivadas de embriões de ratinho. Prevê-se que de cada vez que estabeleçam estas culturas se utilizem todos os DRGs de todos os embriões de modo a reduzir o número de mães/embriões sacrificados. Os modelos com os neurónios embrionários são mais duradouros também e permitem a redução do número de animais total. Estas tarefas só terão lugar nos anos 3, 4 e 5 do projecto, após a caracterização dos alvos moleculares envolvidos na dor. Será apenas sacrificada uma mãe BL6/C57 com embriões E16-E18 mensalmente no ano 3 de projecto (total 12 animais BL6/C57); e uma mãe Wistar com embriões E16-E18 mensalmente nos anos 4 e 5 de projecto (total 24 animais Wistar), reduzindo deste modo ao mínimo o número de animais a utilizar. Pretende-se que os ensaios de eficácia dos compostos sejam também efectuados nestas culturas, bem como os de toxicidade, de modo a reduzir a utilização dos animais <i>in vivo</i> para este propósito.</p> <p>Por último, as amostras colhidas serão utilizadas com uma colaboração interna (FCM e Sea4Us) e uma colaboração externa (SLS/UniNottingham).</p>
<p><b>3. Refinement (Refinamento)</b>  Explique a escolha da(s) espécie e a razão porque o modelo(s) animal que serão usados são os mais refinados, tendo em conta os objetivos. Explique as medidas gerais que serão tomadas para minimizar os custos de bem-estar (danos) aos animais.</p>	<p>Estes modelos animais são os utilizados amplamente na comunidade científica dedicada ao estudo da dor, e são também os que reconhecidamente implicam menos danos ao animal, pois raramente foram observados comportamentos de automutilação, ao contrário do que acontece com outros modelos, por exemplo, os que utilizam técnicas de axotomia nervosa.</p> <p>As gaiolas serão devidamente enriquecidas a nível ambiental, com tubos de papel, serão revestidas com uma cama de carolo de milho, guardadas em local seco e fora do alcance de possíveis contaminações. Os animais serão agrupados em 3 por gaiola, de forma a manterem a sua sociabilidade.</p> <p>Todas as técnicas que envolvam um procedimento cirúrgico (como nos animais CCI) ou injeção dolorosa (como a injeção intra-articular nos CFA), serão acompanhada de anestesia adequada e de monitorização de sinais vitais. A cirurgia será acompanhada por uma cirurgiã plástica experiente em cirurgia animal. Os animais estarão em recobro cerca de 6h após o procedimento, com cama aquecida e será fornecida comida húmida para potenciar a sua recuperação. Será fornecida aos animais analgesia (buprenorfina, 0,05-0,1mg/kg, 12h/12h, subcutânea) nas 72h pós procedimento. Após a cirurgia, será administrado o antibiótico Amoxicilina (ClamoxyI®) 150 mg/Kg a todos os animais e colocar-se-á ainda sobre a sutura um penso em spray para feridas cirúrgicas. Aos animais CFA, será realizada</p>

massagem no joelho após a injeção intra-articular para redução de tensão e edema posterior.

Relativamente aos animais com diabetes-induzida por STZ, como o objectivo é o desenvolvimento de neuropatia diabética, podemos tratar a diabetes, fazendo a implantação de uma bomba de insulina subcutânea, por forma a reduzir a sede e a frequência urinária dos animais devido à Diabetes, bem como a perda de peso. Será também utilizada a medição da glicémia (nível de açúcar no sangue) nos ratos diabéticos.

Todos os procedimentos serão apenas efectuados após o animal estar devidamente habituado ao operador por forma a que o animal venha a cooperar nos procedimentos e tenha níveis reduzidos de stress com os mesmos.

O peso dos animais será também monitorizado e registado durante a experiência. Sempre que os animais demonstrem uma perda de peso superior a 20% do peso inicial os animais serão eutanasiados com sobredose anestésica de pentobarbital.

O bem-estar animal será observado e registado diariamente - Redução ou interrupção da ingestão de alimento; Redução do crescimento ou perda de peso; Mau estado do pêlo; Perda de comportamentos de "grooming"; Segregação relativamente aos outros animais; e apatia – verificar-se-á também se os animais não arrancam pêlo ou têm comportamentos de auto-mutilação; irá verificar-se também, segundo o cronograma (de 3 em 3 dias) a actividade espontânea em campo aberto para ver se esta se mantém activa e será aplicada a Rat Grimace Scale (RGS) – sempre que os animais demonstrem alterações no bem-estar, no pêlo, feridas, comportamentos de auto-mutilação ou diminuição significativa de actividade espontânea (*rear up*) serão eutanasiados com sobredose anestésica de pentobarbital. Se 24h após o procedimento de indução do modelo de dor se verificar que o animal não se apoia nas 4 patas por estar em grande sofrimento/dor, será também eutanasiado com sobredose anestésica de pentobarbital.

<b>Para uso oficial</b>			
O projeto será submetido a avaliação retrospectiva?	Sim	Não	Observações