

REFERÊNCIA DO PROJETO

1.1. Título do projeto de utilização de animais:

Mecanismos moleculares de migração e invasão celular: desenvolvimento de uma nova estratégia para impedir a progressão tumoral

1.2. Nome do investigador responsável pela realização do projeto:

Duarte C. Barral

Modelo de Resumo não técnico de projeto experimental

Título do projeto	Mecanismos moleculares de migração e invasão celular: desenvolvimento de uma nova estratégia para impedir a progressão tumoral		
Duração do projeto	3 anos		
Palavras-chave (máx. 5)	Migração Celular; Tráfego de Membranas; Citoesqueleto de actina; Metastização		
Fim/objetivo do projeto (de acordo com Artº 5º) (1)	Investigação fundamental	x	Não
	Investigação translacional ou aplicada	Sim	x
	Uso regulamentar e produção de rotina	x	Não
	Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais	x	Não
	Investigação destinada à conservação das espécies;	x	Não
	Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais	x	Não
	Inquéritos no domínio da medicina legal	x	Não
	Manutenção de colónias de animais geneticamente alterados (2)	x	Não
Descreva os Objetivos do Projeto (ex., incógnitas científicas ou necessidades científicas/clínicas a serem abordadas, etc)	Já estabelemos in vitro o papel da proteína Arl13b na migração celular em condições não patológicas. Pretendemos investigar se esta proteína regula a invasão e a progressão tumorais in vivo.		

	<p>Propomos como hipótese que a proteína Arl13b possa ser utilizada como biomarcador do processo de metastização do cancro da mama e do cólon e que a modulação dos seus níveis de expressão possa estar na base de uma nova estratégia dirigida para bloquear a disseminação das células cancerígenas. Assim, temos como objetivo investigar o papel da Arl13b na migração, invasão e disseminação de células cancerígenas da mama e do cólon <i>in vivo</i>, analisando a disseminação destas células em modelos animais de murganho.</p>
<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>Identificação de novos marcadores moleculares e alvos terapêuticos em cancro da mama e do cólon.</p>
<p>Que espécies animais e números aproximados de animais serão utilizados?</p>	<p><i>Mus musculus</i> (Balbc/Scid). 50 animais/modelo). A colónia Balb-c/SCID será ampliada e serão utilizadas fêmeas para o modelo de metastização de cancro da mama e machos e fêmeas para o modelo de metastização de cancro do cólon. Serão realizadas duas experiências independentes para cada um dos modelos (modelos de cancro da mama e do cólon). Em cada experiência os grupos serão constituídos por 5 indivíduos, havendo 5 distintos grupos estudo (dois grupos com silenciamento da Arl13b, um grupo com sobre-expressão e dois grupos controlo diferentes).</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>Indução de tumores que serão cirurgicamente removidos para avaliação da formação de metástases. Grau de severidade esperado é moderado. Após o término da experiência os animais serão eutanasiados (método de eutanásia – câmara de CO₂).</p>
<p>Aplicação dos 3Rs</p>	
<p>1.Replacement (Substituição) Refira a razão por que precisa utilizar animais e por que não pode usar alternativas não-animais</p>	<p>Torna-se pertinente a utilização do modelo animal uma vez que existem dados obtidos <i>in vitro</i> que suportam e precisam de validação <i>in vivo</i> e que apontam para o papel importante da proteína Arl13b e seu effector, a miosina NMHC-IIA na invasão e metastização. A validação <i>in vivo</i> permitirá o desenho de uma eventual abordagem terapêutica em humanos.</p> <p>Porque se pretende avaliar o desenvolvimento tumoral e a metastização, os modelos xenografos fornecem o ambiente de um organismo vivo completo para o</p>

	<p>crescimento tumoral. Os modelos escolhidos com injeções na camada adiposa mamária ou na cavidade abdominal no cego proporcionam um ambiente considerado mais fisiológico para o crescimento tumoral.</p>
<p>2.Reduction (Redução) Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais</p>	<p>Na totalidade serão utilizados 100 animais (50/Modelo; modelo de desenvolvimento tumoral da mama e modelo de desenvolvimento tumoral do cólon). Serão realizadas duas experiências independentes para cada um dos modelos (modelos de cancro da mama e do cólon). Em cada experiência os grupos serão constituídos por 5 indivíduos, havendo 5 distintos grupos estudo (dois grupos com silenciamento da Arl13b, um grupo com sobre-expressão e dois grupos controlo diferentes). Será utilizado o número suficiente de animais de forma a assegurar a validade do estudo e reduzir a possibilidade da repetição. Considerando que iremos utilizar uma estirpe de murganhos singénica, a homogeneidade genética entre indivíduos permite-nos utilizar um número reduzido de animais por grupo. O número de 5 animais por grupo em cada experiência reúne o poder estatístico que assegurará a validade estatística e biológica do estudo. Para a determinação do tamanho de cada grupo e o número de animais a utilizar foi utilizada a análise computacional estatística G*Power. Estes modelos já foram utilizados pela equipa de investigação noutra instituição pelo que temos o conhecimento de que o desenvolvimento de tumores em ratinhos Balb-c/SCID inoculados com as linhas celulares que serão utilizadas neste projecto, ocorre em 100% dos indivíduos.</p>
<p>3.Refinement (Refinamento) 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>Serão utilizados métodos de inoculação, cirurgia e eutanásia que asseguram o mínimo sofrimento do animal nos modelos animais de metastização e desenvolvimento tumoral. Os tumores quando atingirem 100 mm³ serão removidos cirurgicamente sob anestesia com inibidor (revertor) e recobro em tapete aquecido até recuperação de 100% de mobilidade. A remoção cirúrgica dos tumores de cancro da mama é necessária uma vez que um dos principais objetivos é o estudo da progressão e metastização tumoral. Assim, impedimos o crescimento excessivo do tumor que reduziria a qualidade de vida do animal. No modelo tumoral de cólon a indução de tumores ortotópicos será por injeção com exposição cirúrgica do cego.</p> <p>Durante dois dias após a cirurgia (modelo de mama e de cólon), os animais serão sujeitos a analgesia (Buprenorfina; 0.05 mg/kg/dia subcutâneo). Os animais</p>

	<p>serão avaliados diariamente em relação à sua condição física dando atenção à postura, tonus muscular e ao “grimace scale” (Lansford, D.J. <i>et al</i>, Coding of facial expression of pain in the laboratory mouse, Nature Methods, <i>in press</i>). Se os parâmetros não estiverem dentro do intervalo aceitável de condição física e mobilidade (animal activo com tónus muscular responsivo e “grimace scale” próximo de 1), o animal será eutanasiado. A validade do estudo depende directamente dos procedimentos propostos e serão respeitados os “humane endpoints”.</p>		
<p>Para uso oficial</p>			
<p>O projeto será submetido a avaliação retrospectiva?</p>	<p>X</p>	<p>Não</p>	<p>Observações</p>