

1.1. Título do projeto de utilização de animais:

Efeito do ciclo alimentar e desequilíbrio metabólico sobre a composição proteica e lipídica das membranas celulares em neurónios cerebrais – implicações fisiológicas e patofisiológicas.

2. Nome do investigador responsável pela realização do projeto:

Pedro Afonso Baltazar dos Santos Lima

Modelo de Resumo não técnico de projeto experimental

Título do projeto	<i>Efeito do ciclo alimentar e desequilíbrio metabólico sobre a composição proteica e lipídica das membranas celulares em neurónios cerebrais – implicações fisiológicas e patofisiológicas.</i>		
Duração do projeto	5 anos (1 Março 2018 a 28 de Fevereiro de 2023)		
Palavras-chave (máx. 5)	Cérebro; Ciclo alimentar; Metabolismo; Diabetes; doenças neurodegenerativas; canais iónicos dependentes da voltagem; lípidos; membrana plasmática		
Fim/objetivo do projeto (de acordo com Artº 5º) ⁽¹⁾	Investigação fundamental	Sim	
	Investigação translacional ou aplicada	Sim	
	Uso regulamentar e produção de rotina		Não
	Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais	Sim	
	Investigação destinada à conservação das espécies;		Não
	Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais		Não
	Inquéritos no domínio da medicina legal		Não

	Manutenção de colónias de animais geneticamente alterados ⁽²⁾		Não
<p>Descreva os Objetivos do Projeto (ex., incógnitas científicas ou necessidades científicas/clínicas a serem abordadas, etc)</p>	<p>A diabetes mellitus poderá ser considerada como uma epidemia nos dias de hoje. Estima-se que a população mundial com diabetes seja da ordem de 387 milhões e que alcance 471 milhões em 2035. O número de diabéticos tem vindo a aumentar em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da maior urbanização, da progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da própria maior sobrevivência de pacientes com diabetes.</p> <p>A influência do cérebro sobre a gestão do balanço energético, com efeito directo sobre o metabolismo periférico, está bem estabelecida. O contrário não é verdade, pelo que urge a necessidade de se estudar os efeitos do metabolismo periférico sobre o funcionamento do cérebro. Neste contexto, o presente projecto acrescentará conhecimento a uma área parcamente estabelecida.</p> <p>Numa primeira fase pretende-se estudar a composição lipídica e proteica de extractos neuro-membranares de cérebros obtidos a partir de ratos alimentados ou no estado de jejum (influência do ciclo alimentar na actividade neuronal). Numa outra abordagem, de modo a se estabelecerem relações entre lípidos e proteínas neuronais e desordens metabólicas, estudar-se-ão as suas composições de neurónios do cérebro de modelos animais diabéticos, tendo como termo de comparação o ciclo alimentar. Assim, amostras de cérebro serão obtidas a partir de ratos controlo e diabéticos, mantidos em condições pós-prandial e jejum. Pretende-se ainda utilizar estas mesmas amostras para, em paralelo, investigar o papel dos canais iónicos no metabolismo da alfa-sinucleína na Doença de Alzheimer, trazendo novos conhecimentos à pato-fisiologia da doença.</p> <p>A segunda fase do projecto, compreende o estudo destes mesmos processos mas em termos de relevância funcional através de estudos da actividade neuronal em neurónios isolados e em fatias de cérebro por técnicas de patch-clamp e current-clamp. Especificamente, pretende-se:</p> <ol style="list-style-type: none"> Desenvolver estudos proteómicos com vista a identificar as proteínas da membrana neuronal cuja expressão se encontra alterada durante o ciclo alimentar. Comparar a expressão diferencial de proteínas entre extractos de ratos diabéticos e ratos controlo, nas condições pós-prandial e jejum. O objectivo é distinguir e determinar a relação entre alterações devidas ao ciclo alimentar (jejum/pós-prandial) e às desordens metabólicas. Promover estudos de lipidómica em ratos diabéticos e controlo com o objectivo de estabelecer diferenças na composição lipídica da membrana neuronal. Desta forma, determinar-se-ão as modificações lipídicas num contexto patológico. Avaliar as implicações das alterações lipídicas ao nível da organização da membrana plasmática. As propriedades biofísicas da membrana serão estudadas através de técnicas de espectroscopia de fluorescência. Aferir a relevância funcional dos resultados obtidos, através de estudos da actividade neuronal e, em particular, da eficácia sináptica em fatias de cérebro de ratos controlo e diabéticos, em condições de jejum e pós-prandial. Aferir a relevância funcional dos resultados obtidos, através de estudos da actividade neuronal e, em particular, da 		

	<p>eficácia sináptica em fatias de cérebro de ratos controlo, em condições de jejum e pós-prandial, e a sua contribuição e relevância para outra doença degenerativa – a doença de Alzheimer.</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>O grande benefício deste projecto resulta da identificação e caracterização de potenciais biomoléculas presentes na superfície das membranas neuronais, cujas funções e disponibilidade se encontrem alteradas mediante o efeito de diferentes condições metabólicas. Assim, poder-se-ão validar novos marcadores biológicos/alvos terapêuticos essenciais na identificação e tratamento de doenças neurodegenerativas associadas a desordens metabólicas, tal como a diabetes. Pretende-se ainda utilizar estas mesmas amostras para, em paralelo, investigar o papel dos canais iónicos no metabolismo da alfa-sinucleína na Doença de Alzheimer, trazendo novos conhecimentos à patofisiologia da doença e abrindo novas vias terapêuticas.</p>
<p>Que espécies animais e números aproximados de animais serão utilizados?</p>	<p><i>Rattus norvegicus</i></p> <p>120 animais Wistar (24 por ano)</p> <p>120 animais Zucker (24 por ano)</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 Ligeiro de severidade com a medição da glicémia.</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>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>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. Ainda assim, nas primeiras experiências a serem efectuadas, compreendendo a optimização de whole-cell e single-channel patch-clamp, e nas experiências a acompanhar a evolução do projecto (animais em pós-prandial e em jejum) poderão ser utilizadas células N1E-115 submetidas a diferentes concentrações de glicose (a mimetizar o jejum e o pós-prandial). Porém, não é possível mimetizar a condição patológica de diabetes em neurónios, pelo que não é possível a total substituição do modelo animal.</p>
<p>2.Reduction (Redução) Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais</p>	<p>Prevê-se, que, por ano, sejam utilizados 24 animais Wistar (12 jejum; 12 pós-prandial) e 24 animais Zucker (6 jejum; 6 pós-prandial Zucker diabéticos; e 6 jejum; 6 pós-prandial Zucker-lean controlo), mantendo o protocolo experimental, totalizando para o projecto inteiro (5 anos) 120 animais Wistar e 120 animais Zucker.</p> <p>Estamos já a reduzir os animais a grupos 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 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 realizadas nos anos 2 e 3 do projecto, terão amostras partilhadas para as diferentes técnicas, bem como algumas experiências de electrofisiologia realizadas nos anos 4 e 5 do projecto. Por último,</p>

	as amostras colhidas serão utilizadas com uma colaboração interna (FCM e Sea4Us) e duas colaborações externas (DQB/FCUL e SLS/UniNottingham).		
<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>	Será apenas utilizada uma técnica que envolve a manipulação dos animais e que é a medição da glicémia (nível de açúcar no sangue) nos ratos Zucker (diabéticos e lean-controlo) – ou seja, nenhum procedimento invasivo será realizado ao animal. A medição da glicémia apenas provoca desconforto ligeiro (pequena picada com lanceta própria na cauda do animal) - esta colheita será feita após o animal estar devidamente habituado ao operador por forma a que o animal venha a cooperar na colheita e tenha níveis reduzidos de stress com o procedimento. 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.		
Para uso oficial			
O projeto será submetido a avaliação retrospectiva?	Sim	Não	Observações