

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**

<b>Título do projeto</b>	<b><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></b>		
<b>Duração do projeto</b>	5 anos (1 Março 2018 a 28 de Fevereiro de 2023)		
<b>Palavras-chave (máx. 5)</b>	Cérebro; Ciclo alimentar; Metabolismo; Diabetes; doenças neurodegenerativas; canais iónicos dependentes da voltagem; lípidos; membrana plasmática		
<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>
	<b>Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais</b>	<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>

	<b>Manutenção de colónias de animais geneticamente alterados <sup>(2)</sup></b>		<b>Não</b>
<p><b>Descreva os Objetivos do Projeto</b> (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.</p> <p>Especificamente, pretende-se:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Desenvolver estudos proteómicos com vista a identificar as proteínas da membrana neuronal cuja expressão se encontra alterada durante o ciclo alimentar.</li> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>Aferir a relevância funcional dos resultados obtidos, através de estudos da actividade neuronal e, em particular, da</li> </ol>		

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