

Órgão Responsável pelo Bem-Estar dos Animais | ORBEA

Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR) | Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC)

Partilha de informação sobre investigação envolvendo animais (no âmbito do Acordo de Transparéncia sobre a Investigação Animal em Portugal que o iCBR subscreveu)

1. INVESTIGADOR RESPONSÁVEL:

Nome completo:	Frederico C. Pereira
Função/cargo:	Professor Associado/Investigador
Instituição de origem:	Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC)
E-mail:	fredcp@ci.uc.pt

2. DETALHES DO PROJETO:

Título:	Speed, crash and run: exersomes boost neuroenergetics and mood in mice on speed (MOODEXERSomes) - POCI-01-0145-FEDER-030786
Data de início:	31-07-2018
Data de término:	30-06-2023
Principais objetivos:	Investigação translacional tendo em vista a prevenção, a profilaxia, o diagnóstico ou o tratamento de doenças, de problemas de saúde ou de outras situações anormais ou dos seus efeitos nos seres humanos

3. IMPACTO ESPERADO (OU JÁ ALCANÇADO):

Potenciais benefícios para o homem (ou para outros seres) e/ou para a sociedade em geral:	Este projeto pretende demonstrar que os benefícios do exercício físico em sintomatologia neuropsiquiátrica do tipo depressiva estão relacionados com alterações na neuroenergética frontocortical e com a libertação de exossomas induzida pelo exercício físico
Resultados já alcançados:	Foi confirmada a presença de vesículas extracelulares no soro dos murganhos pela técnica de Western Blot, TEM e NTA em murganhos C57BL6 sujeitos a um protocolo de exercício aeróbio crónico. Além disso, verificámos um aumento significativo do número de partículas (análise NTA) em animais submetidos a exercício físico crónico em comparação com os animais sedentários.

4. APLICAÇÃO DO PRINCÍPIO DOS 3R's:

Replacement (Substituição) Refira a razão por que precisa utilizar animais e por que não pode usar alternativas não-animais:	O exercício físico (EF) induz profundas mudanças em diversos sistemas/tecidos (e.g. musculo-esquelético, cardíaco, nervoso, conjuntivo, ósseo, adiposo, sanguíneo, imune), interligados na função máxima de manter o organismo vivo e operacional. Assim, a utilização de sistemas experimentais mais simples (e.g. sistemas in vitro) não replica a complexidade fisiológica induzida pelo EF, não sendo métodos alternativos viáveis para alcançar os objetivos propostos neste estudo. O modelo animal escolhido -murganho C57BL6 - é amplamente utilizado em estudos de EF, exibindo elevada similaridade fisiológica em estudos de EF quando comparado com humanos.
Reduction (Redução) Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais:	O número de animais por grupo (n=24) foi estimado tendo em conta os seguintes aspectos: i) A variabilidade intrínseca do modelo animal no que diz respeito aos parâmetros comportamentais e neuroenergéticos; ii) Apesar de pouco frequente, existe a possibilidade de perda de alguns animais

devido a efeitos de toxicidade sistémica (e.g. hipertermia) associados à administração de METH (30mg/kg, i.p.); Estima-se pois que o número alocado a cada grupo experimental (n=24) permita obter uma medida com significância estatística ($p<0.05$) nas diversas metodologias preconizadas, validando os resultados para potenciais aplicações translacionais. O número de animais foi calculado fazendo-se uma análise estatística para detetar efeitos robustos fiáveis. Em suma, os procedimentos experimentais foram desenhados de forma a permitirem a avaliação de múltiplos parâmetros num mesmo animal: exercício físico, análise comportamental, metabolómica e perfil de exossomas circulantes. Este desenho experimental, em conjunto com o conhecimento técnico e académico dos membros da equipa de investigação, garante na execução das tarefas e a obtenção dos objetivos propostos com o menor número possível de animais.

Refinement (Refinamento)

Explique por que razão o animal/modelo que escolheu é o mais adequado para este estudo e que medidas tomou para minimizar os potenciais danos ao seu bem-estar:

Excetuando-se o fenótipo do tipo depressivo que se pretende induzir com o protocolo de administração de METH, não são esperadas alterações ao bem-estar do animal. Efetivamente, os roedores (e.g. murganho C57BL6) são amplamente utilizados para o estudo do EF dada a similaridade fisiológica apresentada por estes animais quando comparada com humanos submetidos a exercício agudo/crónico. Dado que os estudos laboratoriais decorrem em condições controladas ambientais e nutricionais, é assim facilitado o estudo direto dos efeitos fisiológicos promovidos exclusivamente pelo exercício, situação difícil de atingir em humanos. De entre os vários protocolos enunciados na literatura, destacamos a modalidade de passadeira, em condições aeróbicas e de intensidade moderada, a qual potencia diversos benefícios sistémicos e neuropsiquiátricos. Por outro lado, os animais geneticamente modificados que se pretendem utilizar (Rab27a/Rab27b duplo knockout), caracterizados por défices na libertação exossomal, apresentam um fenótipo locomotor e exploratório normal, não se antecipando dificuldades associadas ao protocolo de passadeira. Relativamente a procedimentos e estabelecimento de limites críticos

destacamos: - A implementação de um protocolo de EF em passadeira de intensidade moderada, aeróbico e de longa duração. Efetivamente, o estudo correto dos efeitos do EF é dependente do esforço (volume e intensidade) a que esses animais são sujeitos. Neste sentido, recorreremos a um protocolo de passadeira anteriormente caracterizado pelo grupo, o qual está descrito por manter os valores plasmáticos de lactato inferiores ao limiar anaeróbio (20m/s); -O peso dos animais será avaliado ao longo do protocolo de EF, uma vez por semana. Eventuais alterações posturais e locomotoras serão igualmente avaliadas, bem como a expressão facial dos animais (consultar artigo e acrescentar na bibliografia: "Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse" de Langford et al., 2010)- Como limites críticos estabelecem-se alterações comportamentais dos animais, nomeadamente graves manifestações de stress como redução da ingestão de comida e/ou de bebida e consequente perda de peso superior a 20% (poderá ser equacionada a necessidade de administração de fluidoterapia). Nestes casos, os animais serão occisados com sobredosagem anestésica(cetamina/xilazina).