



## 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:**

<b>Nome completo:</b>	Henrique Manuel Paixão dos Santos Girão
<b>Função/cargo:</b>	Investigador Principal
<b>Instituição de origem:</b>	FMUC-iCBR
<b>E-mail:</b>	hmgirao@fmed.uc.pt

#### **2. DETALHES DO PROJETO:**

<b>Título:</b>	Um novo trabalho para um velho conhecido: para além das gap junctions, a conexina43 medeia a comunicação intercelular via exossomas
<b>Data de início:</b>	01-01-2016
<b>Data de término:</b>	31-12-2020
<b>Principais objetivos:</b>	Apesar de muitas das causas subjacentes ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares serem hoje conhecidas, os mecanismos moleculares associados permanecem ainda pouco explorados. Deste modo, um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos, nomeadamente, ao nível do papel dos exossomas nesta desregulação, é crítico para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas eficientes e para a identificação de novos alvos. No presente projecto, propomos que a conexina43, a principal proteína responsável pela mediação da comunicação directa entre cardiomiócitos adjacentes, possa desempenhar um novo papel, agora na modulação da comunicação a longas distâncias. No contexto cardíaco, uma vez que se sabe que isquemia induz alterações nos níveis de conexina43, propomos estudar o modo como essas alterações podem ter impacto ao nível da comunicação via exossomas, e o seu efeito na exacerbação da patologia. Um outro objectivo deste projecto é mostrar que os exossomas que contêm conexina43 podem ser, de certa forma, mais eficazes na entrega de fármacos

### **3. IMPACTO ESPERADO (OU JÁ ALCANÇADO):**

<b>Potenciais benefícios para o homem (ou para outros seres) e/ou para a sociedade em geral:</b>	As doenças cardiovasculares e o cancro constituem as maiores causas de mortalidade e morbidade, sendo responsáveis por cerca de 60% de todas as causas de morte a nível mundial. Uma vez que as alterações ao nível da comunicação intercelular podem estar na base do desenvolvimento de ambas as patologias, é extremamente importante que se conheçam em detalhe os mecanismos moleculares associados, para que se possam desenhar melhores estratégias terapêuticas no futuro. Assim, a utilização de modelos animais, muito mais representativos do carácter multifactorial sob o qual este género de doenças se desenvolve, permite-nos por um lado, uma mais fiável antecipação das vantagens e riscos associados à estratégia terapêutica que propomos (neste caso, os exossomas como veículo quimioterapêutico) e, por outro lado, uma melhor compreensão dos mecanismos de doença (no contexto deste projecto, relacionada com os distúrbios ao nível da comunicação intercelular mediada por exossomas no coração em isquemia). Assim, a utilização de modelos animais no decurso deste projecto, poderá vir a ser extremamente útil para desenvolvimento de novas oportunidades terapêuticas.
<b>Resultados já alcançados:</b>	Com o decorrer deste estudo foi possível conhecer um pouco mais os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, nomeadamente os mecanismos que durante a isquemia do miocárdio podem levar ao aparecimento de arritmias e que envolvem a desregulação da comunicação intercelular entre as células cardíacas. Deste modo, identificamos a conexina 43 como uma proteína com um papel crucial pela modulação da comunicação por exossomas.

### **4. APLICAÇÃO DO PRINCÍPIO DOS 3R's:**

<b>Replacement (Substituição)</b> Refira a razão por que precisa utilizar animais e por que não pode usar alternativas não-animais:	A utilização de animais é absolutamente necessária e fundamental para a atingir os objectivos estabelecidos no projecto. Em comparação com os métodos alternativos considerados, os modelos animais são muito mais representativos do carácter multifactorial das doenças cardiovasculares e oncológicas, objecto de estudo do presente projecto. Assim, a utilização de animais permite-nos 1) uma mais fiável antecipação das vantagens e riscos associados à estratégia terapêutica que propomos (neste caso, os exossomas como veículo quimioterapêutico) e 2) uma melhor compreensão dos mecanismos de doença (no contexto deste projecto, relacionada com
--	---

	os distúrbios ao nível da comunicação intercelular mediada por exossomas no coração em isquemia). Ambos os procedimentos propostos já foram testados, com resultados muito positivos, em estudos anteriores
<b>Reduction (Redução)</b> Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais:	O número de animais a usar neste estudo foi calculado para que sejam usados apenas os animais suficientes para a obtenção dos objectivos propostos no projecto. A proposta engloba 2 desenhos experimentais distintos com vista à resposta de duas questões científicas bem definidas, nomeadamente o uso de exossomas como veículo terapêutico para a administração de doxorrubicina (por via intratumoral) em tumores subcutâneos bilaterais induzidos em ratinhos atípicos. Por outro lado, propôs-se o uso de culturas primárias de cardiomiócitos e do modelo ex vivo de Langendorff com vista à avaliação da comunicação exossoma-célula, no contexto da fisiopatologia da isquemia cardíaca. Neste caso, foi considerado um grupo de animais a ser usado nas experiências de isolamento de cardiomiócitos adultos, e outro grupo para os ensaios usando o modelo de Langendorff, para avaliação ex vivo da comunicação exossoma-célula.
<b>Refinement (Refinamento)</b> 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:	Em relação ao uso de exossomas como veículo terapêutico, propõe-se o uso de ratinhos Swiss nude, nos quais serão induzidos, bilateralmente, tumores subcutâneos. Nestes animais, será testada a eficácia terapêutica da doxorrubicina incorporada em exossomas. Por outro lado, propõem-se o uso do modelo de Langendorff, usando corações de ratos Wistar. O modelo proposto apresenta inúmeras vantagens – é simples, bem estabelecido e com razoáveis índices de reproduzibilidade, uma vez que constitui um modelo de doença ex vivo. Para além disso, o grupo tem uma vasta experiência no uso deste modelo. Em ambos os casos, os limites críticos humanitários estabelecidos foram os seguintes: sinais de desconforto ou dor severa, perda de peso de 20%, alterações de postura e actividade motora, e desenvolvimento de tumores (diâmetro superior a 20 mm). Todos os procedimentos que possam causar dor, lesão ou danos permanentes no animal serão considerados e minimizados imediatamente através de ocisão, ou tratamento para o alívio de dor e/ou sofrimento do animal.