

REZUMATUL CU CARACTER NONTEHNIC AL PROIECTULUI

Titlul proiectului	Model preclinic de noua generatie pentru evaluarea rolului terapeutic a microARN-205-5p in limitarea metastazei in melanom
Durata proiectului (în luni)	24
Cuvinte-cheie (maximum 5) ⁽¹⁾	Melanom, miR-205, metastazare, tranziție epitelio-mezenchimală
Scopul proiectului ⁽²⁾ (puteți alege mai multe răspunsuri)	- Cercetare translațională și aplicată ⁽³⁾ - Testări ale toxicității și alte testări ale siguranței, inclusiv farmacologie
Obiectivele și beneficiile preconizate ale proiectului	
Descrieți obiectivele proiectului (de exemplu, abordând anumite necunoscute științifice sau anumite necesități științifice sau clinice).	Proiectul de cercetare postdoctorală are ca și scop final limitarea capacitatii de invazie a celulelor de melanom malign prin administrarea exogenă de secvențe de miR-205-5p, miARN puternic subexprimat în celulele cu proveniență metastatică (din ganglioni limfatici) și în țesuturile isolate din organe secundare unde melanomul a invadat. Scopul final constă în păstrarea fenotipului epitelial-like al celulelor sau reversarea fenotipului mezenchimal-like invaziv înapoi în epitelial-like. Rezultatele preliminare demonstrează capacitatea miR-205-5p de a limita migrarea celulelor de melanom malign in vitro prin inhibarea directa a transcriptului ZEB1 si cresterea indirect a nivelului de E-cadherina (CDH1) datorita activitatii de represie a ZEB1 asupra exprimarii CDH1. Aceasta din urma reprezinta principala molecula de adeziune ce stabileste jonctiunile functionale intre celule. Cu toate acestea, modelul celular format dintr-un singur tip de celule nu relevă în totalitate complexitatea întâlnită în cadrul organismului uman. Astfel, se urmărește stabilirea unui model de co-cultură între melanocitele maligne și keratinocite, keratinocitele fiind în contact strâns cu celulele de melanom atât din punct de vedere structural, cât și din punct de vedere al comunicării intercelulare. Astfel, proliferarea și invazia celulelor de melanom malign depinde de pierderea contactului functional stabilit prin exprimarea E-cadherinei dintre celulele de melanom si celulele de melanom si keratinocite. Rolul miR-205-5p în inhibarea metastazei se va testa (<i>in vitro</i> si <i>in vivo</i>) sub influența keratinocitelor, model ce relevă o parte a micromediului tumoral întâlnit în cazul pacienților cu melanom.
Care sunt potențialele beneficii care ar putea rezulta în urma acestui proiect? Explicați modul în care știința ar putea avansa, iar oamenii, animalele sau mediul pot beneficia, în ultimă instanță, de proiect. Acolo unde este cazul, diferențiați între beneficiile pe termen scurt (pe durata proiectului) și beneficiile pe termen lung (care se pot acumula după încheierea proiectului).	Prezentul proiect poate contibui semnificativ la stadiul actual al cunoșterii în domeniul metastazării melanomului malign, contribuție ce poate fi urmată de îmbunătățirea managementului clinic al pacientului și supraviețuirea acestuia. Specific, melanomul malign reprezintă unul din cele mai invazive tipuri de cancer, iar limitarea acestei invazii este crucială pentru supraviețuirea pacientului. Astfel, beneficiul proiectului constă în investigarea unei secvențe necodificatoare, miR-205-5p, ce este puternic subexprimată în contextul melanomului malign, ca și potențial instrument terapeutic pentru această patologie.

	Pe termen scurt (durata proiectului) se urmărește clasificarea miR-205-5p ca posibil instrument terapeutic pentru limitarea metastazării pacienților cu melanom malign. Pe termen lung, se urmărește posibilitatea combinării miR-205-5p cu terapii standard pentru această patologie cu scopul creșterii eficienței terapiei standard și procentului de supraviețuire a pacienților.					
Prejudiciile preconizate	Animalele vor fi supuse unor tehnici cu severitate moderată. Aceste tehnici vor fi desfășurate sub anestezie, moment în care animalul va fi sub monitorizare continuă. La încheierea acestor tehnici animalele vor reveni la starea lor fiziologică și socială inițială cu urmărirea timp de 24 de ore de la ieșirea din starea de anestezie și menținere pe patura electrică în caz de nevoie.					
În ce proceduri vor fi utilizate animalele în mod obișnuit (de exemplu, injecții, intervenții chirurgicale)? Indicați numărul și durata acestor proceduri.	Principalele proceduri <i>in vivo</i> din prezentul proiect sunt: greșarea ortotopică a unui sistem de co-cultură dintre melanocite maligne și keratinocite în zona cutanată a fiecărui animal din experiment (o singură injecție/animal), administrarea de tratament pe bază de miR-205-5p intratumoral (6 injecții consecutive o dată la 2 zile), măsurarea volumului tumoral (înainte de începerea tratamentului – o dată la 2 zile până când greșă atinge 1cm ² , iar apoi înainte de fiecare injecție cu miR-205-5p și înainte de sacrificare), cântărirea șoarecilor (înainte de începerea tratamentului – o dată la 2 zile până când greșă atinge 1cm ² , iar apoi înainte de fiecare injecție cu miR-205-5p și înainte de sacrificare) și sacrificarea animalelor la sfârșitul experimentului. Toate aceste proceduri sunt moderate ca și severitate și se vor realiza sub anestezic local.					
Care sunt impacturile/efectele adverse preconizate asupra animalelor, cum ar fi durerea, pierderea în greutate, inactivitatea/mobilitatea redusă, stresul, comportamentul anormal și durata acestor efecte?	Procedurile propuse sunt moderate ca și severitate și vor fi realizate după administrarea de anestezic local. De asemenea, acestea nu interferează cu greutatea sau inactivitatea/mobilitatea animalelor. Cu toate acestea, manipularea frecventă a animalelor de experiență poate cauza un stres suplimentar ce ar putea conduce la modificarea comportamentului. În cazul în care severitatea efectelor secundare va fi incompatibilă cu viața sau dacă acestea pot debilita animalul într-un mod drastic, acesta va fi eutanasiat prin supradozaj cu un cocktail de xilazina 2% cu ketamina 10%.					
Care sunt speciile și numărul de animale care urmează să fie utilizate? Care sunt nivelurile de severitate preconizate și numărul de animale din fiecare categorie de severitate (per specie)?	Specia ⁽⁴⁾	Numărul estimat în funcție de severitate				
		Numărul total estimat	Fără recuperare	Superficială	Moderată	Severă
	<i>Mus musculus</i> (Șoareci albi)	20			20	

Ce se va întâmpla cu animalele aflate în viață la finalul procedurii? ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾	Numărul estimat care urmează a fi reutilizat	Numărul estimat care urmează a fi returnat într-un habitat/sistem de creștere	Numărul estimat care urmează a fi relocalat		
Vă rugăm să furnizați motive pentru situația planificată a animalelor după procedură.	După relizarea procedurilor, toate animalele vor fi sacrificate, fiind nevoie de de colectarea probelor de țesut tip grefă, dar și a organelor (ficat, plămâni, splină, femur, creier) pentru a evalua posibile situsuri de metastazare.				
Punerea în aplicare a principiului înlocuirii, reducerii și îmbunătățirii					
1. Înlocuirea Indicați alternativele disponibile în acest domeniu care nu folosesc animale și motivul pentru care acestea nu pot fi utilizate în scopul proiectului.	Utilizarea animalelor de laborator in prezentului proiect a fost intr-o oarecare măsură înlocuită cu studii <i>in vitro</i> și studii de analiză date (bioinformatică), reducând astfel într-o mare măsură utilizarea animalelor in procedurile experimentale. Totusi, înlocuirea în totalitate a utilizării acestor animale nu a fost posibilă.				
2. Reducerea Explicați modul în care a fost stabilit numărul de animale pentru acest proiect. Descrieți măsurile luate pentru a reduce numărul de animale care urmează să fie utilizate și principiile folosite pentru elaborarea de studii. După caz, descrieți practicile care vor fi folosite în cadrul proiectului de reducere la minimum a numărului de animale utilizate în conformitate cu obiectivele științifice. Aceste practici pot include, de exemplu, studii-pilot, modelare pe calculator, utilizare în comun de țesuturi și reutilizare.	Numărul de animale folosite în prezentul experiment a fost redus prin utilizarea unor calcule statistice care au relevat numărul minim de animale necesar per grup astfel încat studiul sa nu își piardă semnificația statistică.				
3. Îmbunătățirea Dați exemple de măsuri specifice (de exemplu, monitorizare sporită, asistență postoperatorie, gestionarea durerii, dresarea animalelor) care urmează să fie luate, în legătură cu procedurile, pentru a reduce la minimum costurile bunăstării (prejudiciile aduse) animalelor. Descrieți	Animalele sunt crescute si utilizate intr-o Biobaza autorizata de ANSVSA a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca. Acestea vor beneficia de un spatiu de cazare optim/cap de animal cu imbunatatiri de mediu („enviromental enrichment”). De asemenea, procedurile dureroase vor fi realizate sub analgezie, iar recuperarea animalelor va fi monitorizată zilnic. Dupa realizarea procedurilor sus mentionate, animalele vor fi eutanasiate conform normelor legale.				

mecanismele de preluare a noilor tehnici de îmbunătățire pe durata de viață a proiectului.				
Explicați alegerea speciilor și stadiile de dezvoltare aferente.	Specia aleasa va fi utilizata datorita faptului ca este usor de manipulat, datorita background-ului genetic si a fenotipului imunocompromis ce permite grefarea de celule tumorale umane.			
Proiectele selectate pentru evaluarea retroactivă ⁽⁷⁾ – nu este cazul	Termen-limită	Conține proceduri severe	Utilizează primate nonumane	Alt motiv
<p>⁽¹⁾ Inclusiv condițiile științifice care pot conține mai mult de 5 cuvinte, cu excepția speciilor și a scopurilor înscrise în altă parte în document.</p> <p>⁽²⁾ De furnizat printr-un meniu derulant.</p> <p>⁽³⁾ Lista scopurilor în conformitate cu categoriile și subcategoriile de raportare statistică anuală.</p> <p>⁽⁴⁾ Specii în funcție de categoriile de raportare statistică anuală, cu o opțiune suplimentară de «mamifer nespecificat» pentru a păstra anonimatul în cazuri excepționale.</p> <p>⁽⁵⁾ Speciile care urmează să fie preluate din răspunsul la întrebarea anterioară, corespunzătoare categoriei relevante (proporții).</p> <p>⁽⁶⁾ Sunt posibile mai multe opțiuni pentru fiecare specie în parte.</p> <p>⁽⁷⁾ Puteți alege mai multe răspunsuri."</p>				