

<b>Título do projeto</b>	Estabelecimento do eixo direita-esquerda no organismo modelo peixe-zebra		
<b>Duração do projeto</b>	5 anos		
<b>Palavras-chave (máx. 5)</b>	Eixo direita-esquerda; cílios; peixe-zebra		
<b>Fim/objetivo do projeto</b>  (de acordo com Artº 5º) <sup>(1)</sup>	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		Não
	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 <sup>(2)</sup>	Sim	
<b>Descreva os Objetivos do Projeto</b> (ex., incógnitas científicas ou necessidades científicas/clínicas a serem abordadas, etc)	<p>Este projeto pretende descobrir os mecanismos durante o desenvolvimento embrionário que levam ao estabelecimento da lateralidade dos órgãos viscerais em vertebrados.</p> <p>Este processo inicia-se num órgão embrionário denominado o organizador da direita-esquerda. Este órgão é ciliado, ou seja é formado por cerca de 60 células que possuem um cílio cada uma e fica na zona da cauda do embrião de peixe-zebra.</p> <p>Os cílios são protuberâncias das células semelhantes a cabelos finos (por vezes</p>		

denominados flagelos) que servem para produzir fluxos de líquidos através da sua motilidade. Dentro deste órgão produz-se assim um fluxo de líquido direcional que é mais forte para o lado esquerdo do embrião e que vai ser responsável pelo início de uma cascata genética ainda muito mal compreendida.

Sabemos que os genes alvo vão originar que o coração fique do lado esquerdo e o fígado do lado direito em humanos. Desta forma necessitamos de linhas de peixe-zebra que nos permitam seguir e manipular este processo desde:

- a) a visualização dos cílios em movimento;
- b) a visualização de membranas das células deste órgão;
- c) a manipulação de algumas proteínas já conhecidas e envolvidas no processo de sinalização molecular da lateralidade;
- d) necessitamos ainda de ver os órgãos propriamente ditos e a sua posição final em larvas vivas.

O peixe-zebra é o modelo animal ideal para este estudo visto que devido à sua transparência não necessitamos invadir nem eutanizar as larvas para visualizar todos estes passos.

Quando este processo da lateralidade não é bem sucedido durante o desenvolvimento do embrião em humanos surge uma doença genética rara denominada 'discinesia ciliar primária (DCP)' que pretendemos ajudar a tratar com investimento na investigação básica.

Quais são os potenciais benefícios que possam derivar deste projeto (como poderia a ciência avançar ou os seres

Os benefícios serão:

- O conhecimento de um processo de desenvolvimento embrionário que ainda não se conhece bem,

<p>humanos ou outros animais poderiam beneficiar com o projeto)?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A potencial terapia para a DCP</li> <li>• O conhecimento do mecanismo de ação molecular da PKD2 que está também envolvida na doença renal ADPKD (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease).</li> </ul> <p>Deste projeto virão vantagens para 3 campos distintos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• a biologia do desenvolvimento</li> <li>• doença genética rara DCP</li> <li>• doença genética muito comum dos rins poliquísticos.</li> </ul>
<p>Que espécies animais e números aproximados de animais serão utilizados?</p>	<p>Peixe zebra (Danio rerio):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2050 animais no CEDOC</li> <li>• 400 animais no IGC</li> </ul> <p>Estes representam o número de animais utilizados durante 5 anos, em aquários com uma densidade de 20 animais por 3,5L de água com condições controladas e monitorizadas. Nenhum destes animais vai ser alvo de procedimentos severos ou graves. Sendo o único procedimento a reprodução da espécie que é isenta de qualquer manipulação invasiva ao animal.</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>Não haverá efeitos adversos. Os animais mantidos em heterozigotia não apresentam fenótipos nocivos. As linhas serão mantidas no biotério para uso do nosso e outros laboratórios.</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>Para a realização de estudos sobre o desenvolvimento embrionário, nomeadamente no estabelecimento do eixo direita-esquerda é necessária a utilização de embriões enquanto organismos inteiros para avaliar o posicionamento dos órgãos internos assimétricos como o coração, o</p>

	<p>fígado e o pâncreas inexistentes em alternativas não animais.</p> <p>Neste projeto optou-se pela utilização do peixe-zebra pois são ovíparos o que permite ter acesso a embriões e a formas larvares sem alimentação autónoma sem existir necessidade de eutanasiar nenhum dos progenitores, em oposição a outros modelos nomeadamente rato ou ratinho.</p>
<p><b>2.Reduction (Redução)</b>  Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais</p>	<p>O peixe-zebra atinge a sua maturidade sexual aos 3 meses e mantem-se em idade reprodutora até aos 18 meses.</p> <p>Para garantir o bem-estar animal os animais acasalam no máximo 1x a cada 15 dias. Para suportar as necessidades de embriões WT para a realização do projeto são necessários 3 tanques com 10 casais saudáveis cada (20 animais) por semana. De forma a obtenção de ovos à terça-feira, quarta-feira e quinta-feira de cada semana.</p>
<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>	<p>O <i>Danio rerio</i> tem vindo a estabelecer-se como modelo animal há mais de 20 anos. É um excelente modelo para estudos do desenvolvimento embrionário por permitir que um casal de animais reprodutores tenham posturas de mais de 100 ovos semanalmente sem comprometer o bem-estar ou a saúde animal.</p> <p>Como este projeto tem por objetivo de estudo o conhecimento do estabelecimento de eixo direita-esquerda que ocorre às 10h após fertilização num órgão embrionario transiente, a Vesícula de Kupffer, todos os procedimentos e manipulações são realizados nos embriões ou em estados larvares sem alimentação autónoma.</p> <p>Assim sendo este modelo permite que com um número reduzido de animais reprodutores se consiga obter ovos em número suficiente, para</p>

	várias experiências e procedimentos com significado estatístico sem nunca pôr em causa a saúde e o bem estar animal dos animais reprodutores tornando o peixe-zebra um modelo refinado para estudos de embriologia.		
<b>Para uso oficial</b>			
O projeto será submetido a avaliação retrospectiva?		Não	A utilização é terminal