

1.1. Título do projeto de utilização de animais:

Estudos genéticos e celulares da doença cardíaca congénita, e do estabelecimento do eixo embrionário Esquerdo-Direito

1.2. Nome do investigador responsável pela realização do projeto:

José A. Belo

Modelo de Resumo não técnico de projeto experimental

Título do projeto	Estudos genéticos e celulares da doença cardíaca congénita, e do estabelecimento do eixo embrionário Esquerdo-Direito		
Duração do projeto	5 anos		
Palavras-chave (máx. 5)	Embriogénese, cardiogénese, eixos de simetria		
Fim/objetivo do projeto (de acordo com Artº 5º) ⁽¹⁾	Investigação fundamental	Sim	Não
	Investigação translacional ou aplicada	Sim	Não
	Uso regulamentar e produção de rotina	Sim	Não
	Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais	Sim	Não
	Investigação destinada à conservação das espécies;	Sim	Não
	Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais	Sim	Não
	Inquéritos no domínio da medicina legal	Sim	Não
	Manutenção de colónias de animais geneticamente alterados ⁽²⁾	Sim	Não
Descreva os Objetivos do Projeto (ex., incógnitas científicas ou necessidades científicas/clínicas a serem abordadas, etc)	O objectivo deste projectos é o estudo aprofundado dos vários estádios de indução e desenvolvimento do coração usando os ratinhos mutantes para os genes Cerl-2, e Ccbe1, assim como ratinhos transgénicos como modelos experimentais. Estes estudos serão utilizados para obtenção de novos conhecimentos relacionados com as		

bases genéticas e celulares da doença cardíaca congénita e com os defeitos de lateralidade.

As doenças cardiovasculares caracterizadas por defeitos funcionais nos cardiomiócitos ou pela sua perda total são uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos. Recentemente o nosso laboratório demonstrou que a perda de função do gene *Cerl2* em ratinho leva a um espessamento significativo das paredes ventriculares devido ao aumento do índice mitótico dos cardiomiócitos da camada compacta do miocárdio, e anteriormente este gene tinha também sido descrito por nós como essencial para o estabelecimento do eixo de simetria esquerdo/direito. Pretendemos continuar a examinar os mecanismos subjacentes às funções de *Cerl2*, e como este controla as cascatas de sinalização que induzem a proliferação de cardiomiócitos, usando para isso os modelos *Cerl2* KO *in vivo* e *in vitro*, tentando obter estratégias para melhorar a reduzida capacidade regenerativa do coração.

Por outro lado, o nosso laboratório identificou recentemente um outro gene – *Ccbe1* – que está altamente enriquecido em células progenitoras cardíacas durante o desenvolvimento cardíaco e parece estar envolvido também na proliferação dos cardiomiócitos. Assim iremos usar também modelos *Ccbe1* KO *in vivo* e *in vitro* para estudar a função deste gene mais em pormenor.

Tendo em conta que ambas os genes codificam para proteínas secretadas que, aparentemente, têm alguma função no desenvolvimento e proliferação de cardiomiócitos, estas proteínas são excelentes candidatas para testar se elas aumentariam a produção de cardiomiócitos.

Num contexto mais geral o objetivo deste projeto é portanto definir estratégias para melhorar a reduzida

	capacidade regenerativa do coração. A informação resultante dar-nos-á maiores bases para o conhecimento dos genes-alvo e das vias de sinalização cruciais para o controlo da cardiogénese para poder assim manipular/estimular a produção de cardiomiócitos.
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)?	Potencialmente este estudo dará a base do conhecimento que possibilitará o desenvolvimento de técnicas para aperfeiçoar a obtenção de elevados números de cardiomiócitos não geneticamente alterados e, portanto, seguros para o uso em contexto de medicina regenerativa do coração.
Que espécies animais e números aproximados de animais serão utilizados?	Murganho, 300/ano
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?	Manutenção de linhas geneticamente alteradas sem efeitos adversos espectáveis. Grau de severidade ligeiro, ou não recuperação. Ocissão
Aplicação dos 3Rs	
1.Replacement (Substituição) Refira a razão por que precisa utilizar animais e por que não pode usar alternativas não-animais	O estudo da formação dos eixos de simetria, e do coração precisa de um modelo animal <i>in vivo</i> por envolver estudos em que as estruturas 3D tanto dos eixos, como da formação do coração são essenciais e insubstituíveis por culturas celulares ou estudos de populações de células com pouca diversidade e complexidade. Alguns estudos do projeto são feitos com amostras de tecidos humanos obtidos através de protocolos com hospitais e de pacientes/famílias que se mostraram interessadas em participar nestes estudos. Serão usadas Células Estaminais Embrionárias (ESCs) e células pluripotentes induzidas (iPS) que são vistas como uma potencial fonte de progenitores cardíacos compatíveis com os pacientes no contexto da medicina regenerativa,

	<p>bem como uma fonte de tecido cardíaco para a triagem de fármacos <i>in vitro</i>.</p>		
<p>2.Reduction (Redução) Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais</p>	<p>Muitas experiências são já feitas em cultura de células, e noutros casos os tecidos obtidos de formas fetais são cultivados e quando possível algumas experiências são feitas <i>in vitro</i> usando as células/tecidos obtidas.</p> <p>Manutenção quando possível das linhas em homozigotia o que assegura que o número mínimo de animais é produzido</p> <p>Partilha de tecidos/material biológico com outros membros do grupo, e grupos externos para evita utilização de maior número de animais</p>		
<p>3.Refinement (Refinamento) 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>Nos casos em que possa existir alta letalidade e/ou fenótipos adversos utilizar estratégia de cruzamentos em heterozigotia para obtenção de formas fetais homozigóticas</p> <p>Quando a linha não apresenta fenótipo adverso fazer a manutenção da linha GA em homozigotia para não haver necessidade de genotipagem.</p> <p>Os animais são alojados em grupo sempre que possível depois do desmame, em gaiola com cama e material de ninho/esconderijo.</p> <p>Humane endpoints: Monitorização de peso, condição física, e comportamental. Se fora de parâmetros normais os animais serão eutanasiados por método humano. Se a classificação de severidade de algum procedimento proposta exceder severidade moderada, os animais serão eutanasiados.</p> <p>Monitorização e registo para cada linha GA mantida, do bem estar animal em tempos determinados: nascença, desmame, maturidade sexual, e verificação a longo termo de parâmetros de bem-estar relacionados com a idade.</p> <p>Animais que não serão necessários, ou utilizados serão eutanasiados.</p>		
<p>Para uso oficial</p>			
<p>O projeto será submetido a avaliação retrospectiva?</p>	<p>Sim</p>	<p>Não</p>	<p>Observações</p>

