

Título do projeto	Reprogramação e plasticidade celular durante a regeneração óssea em peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)		
Duração do projeto	5 anos		
Palavras-chave (máx. 5)	Regeneração; Osteoblastos; peixe-zebra; Reprogramação; Tecido ósseo		
Fim/objetivo do projeto (de acordo com Artº 5º) ⁽¹⁾	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 ⁽²⁾		Não
Descreva os Objetivos do Projeto (ex., incógnitas científicas ou necessidades científicas/clínicas a serem abordadas, etc)	<p>Este projeto tem como principal objectivo perceber os mecanismos celulares e moleculares que controlam a regeneração do tecido ósseo após amputação da barbatana caudal do peixe-zebra.</p> <p>Pretendemos compreender não só como os osteoblastos associados ao osso conseguem responder ao dano e formar novos osteo-progenitores, mas também perceber quando na ausência destes osteoblastos, que outros tipos celulares têm a capacidade de formar osteo-</p>		

	<p>progenitores e assegurar que o processo regenerativo prossiga corretamente.</p>
<p>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)?</p>	<p>Este tópico é de grande importância devido à grande predominância de patologias ósseas na população humana.</p> <p>Desta forma, através do uso do peixe-zebra como modelo de estudo, pretendemos aprofundar o nosso conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes à regeneração do tecido ósseo, e contribuir no futuro para promover o aparecimento de estratégias terapêuticas mais eficientes.</p> <p>Estas estratégias poderão ter grande impacto durante, por exemplo, o aparecimento de fracturas ósseas e perdas substanciais de tecido ósseo em humanos, como é o caso da osteoporose.</p>
<p>Que espécies animais e números aproximados de animais serão utilizados?</p>	<p><i>Danio rerio</i> - 297 animais</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>Todos os animais do projeto serão sujeitos a amputação da barbatana caudal para despoletar o processo regenerativo. Este procedimento é feito sobre anestesia e não causa perda de autonomia ao animal.</p> <p>Alguns animais serão também sujeitos a administração de drogas/fármacos na água, protocolos de choque térmico ou a injeção intraperitoneal. Nem os fármacos utilizados nem o choque-térmico afetam a autonomia do animal após o procedimento.</p> <p>Todos os procedimentos efectuados durante o decorrer do projeto são considerados ligeiros.</p> <p>Dado que a maioria dos animais utilizados no projeto são linhas transgênicas: animais apenas sujeitos a</p>

	<p>amputação da barbatana caudal são mantidos nas instalações do biotério de peixes para manutenção de linhas; animais sujeitos a amputação de cauda e a outro procedimento adicional, administração de drogas (na água ou via intra-peritoneal) ou a choque-térmico, são occisados nas instalações do biotério.</p>
<p>Aplicação dos 3Rs</p>	
<p>1.Replacement (Substituição) Refira a razão por que precisa utilizar animais e por que não pode usar alternativas não-animais</p>	<p>O processo regenerativo é um processo muito particular e complexo que só alguns animais é que o possuem.</p> <p>O peixe-zebra é um dos modelos animais mais usados para estudar processos regenerativos devido à sua capacidade excepcional de regenerar vários tecidos.</p> <p>O processo regenerativo do tecido ósseo é bastante complexo, uma vez que depende do ambiente que é gerado após amputação e da comunicação entre vários tipos celulares presentes na zona afetada.</p> <p>Este tipo de ambiente presente após amputação, bem como a heterogeneidade celular, são impossíveis de recriar em qualquer modelo celular que esteja de momento disponível.</p>
<p>2.Reduction (Redução) Explique como garantirá que serão utilizados os números mínimos de animais</p>	<p>Para cada desenho experimental e intervalo de tempo a analisar vai ser utilizado o número mínimo de animais (3 a 4 peixes-zebra) de forma a ser possível verificar resultados significativamente diferentes entre controlos e condições experimentais.</p> <p>O número de animais a utilizar tem em consideração um nível de significância de 5%, uma potência de 90% e uma diferença considerada significativa entre condições experimentais de 5%.</p> <p>A única exceção verifica-se no procedimento de isolamento de osteoblastos por FACS, onde será</p>

	<p>utilizado o número mínimo de animais que garanta células suficientes para os ensaios posteriores.</p> <p>Nos ensaios em que se utilizem linhas transgênicas de choque térmico, a condição controlo é feita para controlar o efeito do choque térmico em animais WT (AB) sendo igual para todas as linhas. Desta forma, o ensaio será feito ao mesmo tempo para todas as linhas de forma a que apenas se use apenas um grupo de peixes controlo.</p>
<p>3. Refinement (Refinamento)</p> <p>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>Uma vez que o objetivo deste projeto é estudar a regeneração do tecido ósseo, o peixe-zebra preenche todos os requisitos para ser usado como modelo animal.</p> <p>O peixe-zebra tornou-se um modelo muito popular para o estudo de processos regenerativos, oferecendo a oportunidade única de investigar os mecanismos que regulam este processo. As vantagens de usar este modelo incluem facilidade de reprodução, manutenção e possibilidade de manipulação genética.</p> <p>A barbatana caudal é um dos tecidos do peixe-zebra mais usados para estudar regeneração, sendo um dos seus maiores componentes o tecido ósseo. Desta forma optamos por usar a barbatana caudal para os estudos de regeneração óssea, uma vez que apresenta as seguintes vantagens comparativamente a outros modelos animais: após amputação a barbatana caudal regenera num curto espaço de tempo; esta estrutura é de fácil acesso; a cirurgia de amputação é muito simples e não compromete a sobrevivência do animal.</p> <p>Os procedimentos de amputação e recolha da barbatana caudal são procedimentos ligeiros que</p>

são efectuados em animais devidamente anestesiados.

A grande maioria das drogas usadas neste projeto são administradas na água. O facto de serem administradas na água e não injetadas diretamente no animal diminui muito o seu mal-estar e sofrimento, uma vez que o animal não necessita de ser anestesiado nem sofre qualquer dano físico causado por uma possível injeção.

Uma das drogas/fármaco utilizadas neste projeto terá de ser administrada via intraperitoneal. Para tal, os animais são previamente anestesiados e manipulados à lupa, para nos certificarmos que a agulha é inserida diretamente na cavidade abdominal sem danificar outras estruturas.

Mais uma vez garantimos que todos os procedimentos efectuados neste projeto são executados por utilizadores experientes, ou sob supervisão, e que todos os animais adultos, transgénicos, mutantes e reprodutores utilizados sejam sujeitos ao mínimo de sofrimento ou dor possível durante o decorrer deste projeto.