



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – CAMPUS
CURITIBANOS**
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NA ÁREA DE
REPRODUÇÃO ANIMAL

Esdras Corrêa dos Santos

Curitibanos, 4 de dezembro de 2017

ESDRAS CORRÊA DOS SANTOS

ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NA ÁREA DE
REPRODUÇÃO ANIMAL

Relatório de estágio curricular obrigatório submetido ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em medicina veterinária.

Orientador: Valério Valdetar Marques Portela

Supervisor: Christopher Alan Price

CURITIBANOS
DEZEMBRO DE 2017

ESDRAS CORRÊA DOS SANTOS

**ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO EM MEDICINA VETERINÁRIA EM
REPRODUÇÃO ANIMAL**

Esse relatório de estágio, foi julgado adequado para obtenção do título
de Médica Veterinária e aprovado em sua forma final
Curitibanos, 4 de dezembro de 2017

Prof. Alexandre de Oliveira Tavela
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Valério Valdetar Marques Portela Jr
Orientador

Prof. Adriano Tony Ramos
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcos Henrique Barreta
Universidade Federal de Santa Catarina

IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁGIO

ESTÁGIO EM BIOLOGIA REPRODUTIVA

Instituição: Université de Montréal – Faculté de Médecine Vétérinaire

Área: reprodução animal

Endereço: 3200, rue Sicotte Saint-Hyacinthe (Québec) J2S 2M2

Supervisor do Estágio: Prof. Dr. Christopher Alan Price e Anthony

Daniel Estiene

Período de Estágio: 03/08/2017 a 04/12/2017

Carga Horária: 720 horas

RESUMO

Estágio curricular obrigatório em medicina veterinária com ênfase em biologia reprodutiva realizado no laboratório do Prof. Christopher Alan Price no *Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité (CRRF)* da Faculté de Médecine Vétérinaire – Université de Montréal. O estágio foi realizado graças ao apoio do governo do Canadá através do programa “Emerging Leaders in the Americas Program – ELAP” que proporciona a estudantes latino americanos a oportunidade de estudar e desenvolver projetos em Universidades Canadenses. O estágio teve como principal foco a finalização de um projeto relacionado ao papel do sulfeto hidrogênio na ovulação em camundongos. Porém no decorrer do estágio foram realizadas diversas outras atividades relacionadas a outros projetos e ao CRRF, que somaram um total de 720 horas.

Palavras chave: estágio curricular, biologia reprodutiva, ELAP.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	CENTRO DE PESQUISA EM REPRODUÇÃO E FERTILIDADE (CENTRE DE RECHERCHE EN REPRODUCTION ET FERTILITÉ – CRRF) ..	8
2.1	Atividades desenvolvidas.....	8
2.2	Cultivo de células e folículos <i>in-vitro</i>.....	9
2.2.1	Cultivo de células da granulosa em ovinos e bovinos	9
2.2.2	Cultivo de células da granulosa de camundongos.....	11
2.2.3	Cultivo de folículos <i>in-vitro</i>.....	13
2.3	Biologia Molecular.....	15
2.4	Outras atividades	19
3	CONCLUSÃO.....	20
4	REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

Segundo parecer CNE/CES 105/2002, a formação do médico veterinário deve garantir o desenvolvimento de estágios curriculares, sob supervisão docente. A carga horária mínima do estágio curricular supervisionado deverá atingir 10% da carga horária total do Curso de Graduação em Medicina Veterinária proposto, com base no Parecer/Resolução específico da Câmara de Educação Superior do Conselho Nacional de Educação.

O estágio curricular poderá ser realizado na Instituição de Ensino Superior e/ou fora dela, em instituição/empresa credenciada, com orientação docente e supervisão local, devendo apresentar programação previamente definida em razão do processo de formação (MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO/ CONSELHO NACIONAL DE EDUCAÇÃO, 2002).

O escopo aqui relatado foi realizado com parceria ao governo do Canada, através da bolsa de estudos com nome “Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP)”, em português “Programa Futuros Líderes nas Américas”. A bolsa de estudos é ofertada aos estudantes e pesquisadores da América Latina e do Caribe com oportunidades de intercâmbio de curto prazo para estudo ou pesquisa, no Canadá, nos níveis de graduação e pós-graduação.

O estágio foi realizado no laboratório do Pesquisador Dr. Christopher Alan Price, dentro do Centro de pesquisa em reprodução animal chamado “Centre de recherche en reproduction et fertilité (CRRF)” que está inserido no reconhecido grupo de pesquisa canadense em reprodução “Réseau Québécois en reproduction”.

Todos os trabalhos no laboratório faziam parte de projetos os quais possuem autorização do comitê de ética da universidade (Le Comité d'éthique de l'utilisation des animaux – CÉUA). O objetivo deste relatório é descrever as atividades realizadas durante o estágio curricular obrigatório, assim como a frequência de atividades desenvolvidas.

2 CENTRO DE PESQUISA EM REPRODUÇÃO E FERTILIDADE (CENTRE DE RECHERCHE EN REPRODUCTION ET FERTILITÉ – CRRF)

O local selecionado para realização do estágio foi a Faculté de médecine vétérinaire (FMV) da Université de Montréal situados em Saint-Hyacinthe, à aproximadamente 60 km do campus sede da Université de Montreal e ao coração da mais importante zona agroalimentar do Québec. O *Centre de Reproduction et Fertilité* (CRRF) da Faculté de Médecine Vétérinaire da Université de Montréal desde a sua criação em 1972, tem seu programa de pesquisa focado no estudo da reprodução em grandes animais domésticos e, atualmente, é um dos maiores centros de pesquisa neste campo no Canadá. A infraestrutura do CRRF vem da Université de Montréal. Os pesquisadores desenvolvem projetos com financiamento de agências de doações provinciais, federais, universitárias, industriais ou privadas.

Dentro do CRRF o estágio foi desenvolvido no laboratório do Professor Dr. Christopher A. Price, o qual tem trabalhado nos últimos anos com objetivo geral de entender melhor a regulação da saúde e da sobrevivência das células foliculares. Principalmente durante o desenvolvimento folicular, onde há crescimento significativo do folículo e proliferação e diferenciação de células granulosa e de células da teca. Sobre estes eventos fisiológicos atualmente é estudado os papéis dos membros da família do fator de crescimento de fibroblástico (FGF). A família dos FGFs é uma das maiores famílias dos fatores de crescimento composta por 25 membros (FGF 1-25) (KATOH & KATOH, 2005), sendo que 23 FGFs já foram descritos em mamíferos (ITOH & ORNITZ, 2004). Além de trabalhos realizados com a família dos gasotransmissores [óxido nítrico (NO), o monóxido de carbono (CO) e o sulfeto de hidrogênio (H₂S)] (FEELISCH e OLSON, 2013) em especial o sulfeto de hidrogênio (H₂S) durante o processo ovulatório.

2.1 Atividades desenvolvidas

As atividades realizadas tiveram como objetivo elucidar questões científicas levantadas nos projetos de pesquisa dos estudantes de pós-graduação do Laboratório. Os cultivos de células da granulosa de camundongos

e o cultivo de folículos de camundongo foram o principal foco das atividades, as quais participei pois faziam parte do tema de me foi concedido para pesquisar.

Portanto, a maior parte do estágio foi dedicada ao estudo do papel do sulfeto de hidrogênio (H₂S) na ovulação em camundongos. Para isto foram realizados diversos experimentos que envolviam: o cultivo de células da granulosa de camundongos, cultivo de folículos de camundongos e técnicas auxiliares como western blot e qPCR, para a melhor compreensão da possível influência desta molécula na ovulação. Os outros experimentos realizados *in-vitro* foram parte de projetos de outros estudantes de pós-graduação do laboratório.

2.2 Cultivo de células e folículos *in-vitro*

Os experimentos listados na tabela 1 são os principais meios utilizados para obter resultados dos projetos realizados no laboratório. De modo geral, são experimentos que exigem certa prática e conhecimento de quem está aplicando e possuem variações entres as espécies e técnica aplicada.

Tabela 1. Frequência de atividades relacionadas a cultivo de células e folículos *in-vitro*.

Atividades desenvolvidas	Frequência
Cultivo de células da granulosa bovinos	2
Cultivo de células da granulosa ovinos	6
Cultivo de células da granulosa de camundongos	8
Cultivo de folículos antrais	6
Cultivo de células endoteliais	2
Coleta de oócitos equinos*	5

*projeto realizado para avaliação de viabilidade, após coletados eram enviados para outro país.

2.2.1 Cultivo de células da granulosa em ovinos e bovinos

Para a realizar os experimentos eram coletados ovários no abatedouro regional escolhendo-se os melhores ovários com maiores números de folículos para o cultivo e armazenados em solução salina a temperatura ambiente. Previamente o fluxo laminar era limpo com álcool 70%, forrado com papel

absorvente, então os materiais eram dispostos no interior e acionado a luz ultravioleta por aproximadamente 15 minutos.

Assim que os ovários eram recebidos do abatedouro eles eram lavados com solução salina seguidos de outra lavagem com etanol. Após as lavagens, eram mantidos em solução salina em temperatura ambiente até serem dissecados.

Para a dissecação primeiramente era feita separação do ovário dos tecidos adjacentes. Em seguida, é feito um corte sagital no ovário separando-o em duas partes iguais. Uma das partes é posta em uma placa petri contendo meio de lavagem enquanto faz-se a dissecação (Figura 1) da outra metade do ovário sempre selecionando folículos entre 3-6 mm, utilizando tesouras tipo mayo, e colocando os folículos dissecados em um tubo 50 ml contendo meio de lavagem. Finalizado a dissecação de todos os ovários era realizada a lavagem dos folículos dissecados, agitando o tubo suavemente e trocando o meio de lavagem por três vezes seguidas.

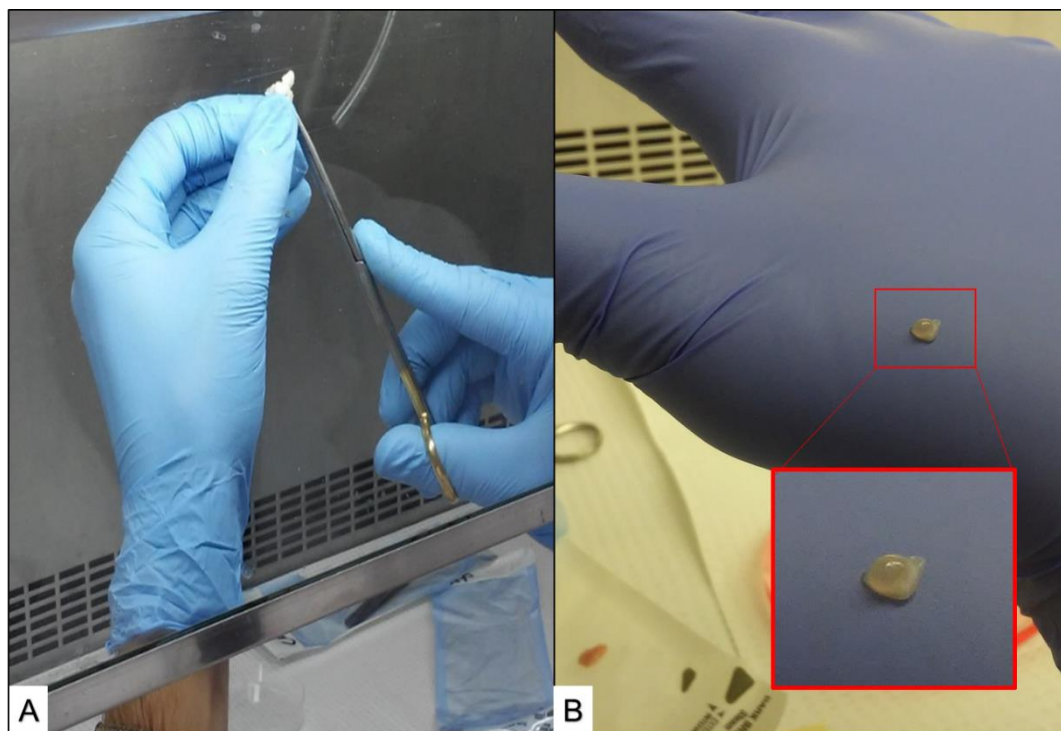


Figura 1 – A: dissecação de folículos em ovário ovino. B: detalhe em vermelho em maior aumento mostrando um folículo dissecado.

Depois da última lavagem os folículos eram postos em uma nova placa petri com meio de lavagem e com ajuda de uma pinça pequena e tesoura íris cada folículo era aberto expondo as células da granulosa. Finalizado a abertura dos folículos e passado em um filtro todo o conteúdo da placa a qual continha os folículos abertos e o meio de lavagem rico em células da granulosa. O filtro possui uma malha “mesh 150” aproximadamente 9 μ m de diâmetro, onde somente as células passarão dentre elas as células da granulosa. O filtrado é posto em um novo tubo e em seguida centrifugado por 15 minutos à 980 rpm.

O sobrenadante é removido, o pellet é re-suspendido em meio de lavagem e centrifugado novamente. Após a última centrifugação suspende-se o pellet e coleta-se uma amostra de 40 μ l adicionado do corante TRYPAN BLUE (10 μ l) o qual cora as células mortas facilitando a contagem das células em câmara de Neubauer. Dependendo da contagem de células vivas era feito a diluição do meio de cultura contendo as células com objetivo de obter 1.000.000 de células/ml. Feito isso as células eram semeadas (1000 μ l/poço) em placas de 24 poços para cultivo de 6 dias.

Durante estes 6 dias eram realizadas trocas do meio a cada 48 horas, nos quais eram removidos 700 μ l do meio velho e adicionado meio novo com o tratamento de acordo cada projeto, mas sempre com insulina para possibilitar que as células possam utilizar a glicose do meio de cultura. Ao final no último dia era removido o máximo de meio de cultura e adicionado buffer de lise para ser feito o a extração de RNA. A placa normalmente era isolada com papel sulfitee armazenada em freezer -80°C para proteção do RNA já que neste período o RNA não é estável.

2.2.2 Cultivo de células da granulosa de camundongos

No biotério da universidade era feito a primeira etapa do cultivo de células da granulosa de camundongos (CCGC) com a preparação dos animais (C57B/6 w-t – idade entre 24 a 26 dias de idade) administrando injeções de 150 μ l gonadotrofina coriônica equina (eCG) para superovulação. Para ter acesso aos camundongos eram feitos diversos procedimentos de biossegurança como troca de vestimenta, utilização de luvas, máscara, toca e protetores de braço. Quando era feito injeções nos camundongos já se aproveitava o tempo para se verificar os nascimentos da semana e para planejar as próximas datas de tratamento.

Após 48 horas do tratamento do eCG os camundongos eram eutanasiados de acordo com manual de ética da universidade utilizando-se isoflurano no interior da capela de fluxo de ar contínuo, seguido de deslocamento cervical e posicionado em decúbito dorsal. Para facilitar dissecação sempre era borrifado álcool 70% na região ventral, seguida da abertura da cavidade abdominal e dissecação dos ovários. Cada ovário é colocado em uma placa de petri pequena (35 mm de diâmetro) contendo 1 ml de meio de cultivo. Então, com agulhas de insulina 30 Gauges inicia-se a extração das células (Figura 2). Normalmente uma das agulhas era utilizada para apoiar o ovário no fundo da placa, e outra para fazer inúmeras perfurações no ovário através de movimentos constantes e repetitivos. Quando o tecido ovariano estava bem fragmentado na placa, com a pipeta era feito a homogeneização e filtragem em filtros de plástico (cells strainers). Com mais 500 μ m de meio de cultura é feito a lavagem da placa, o qual também era filtrado.

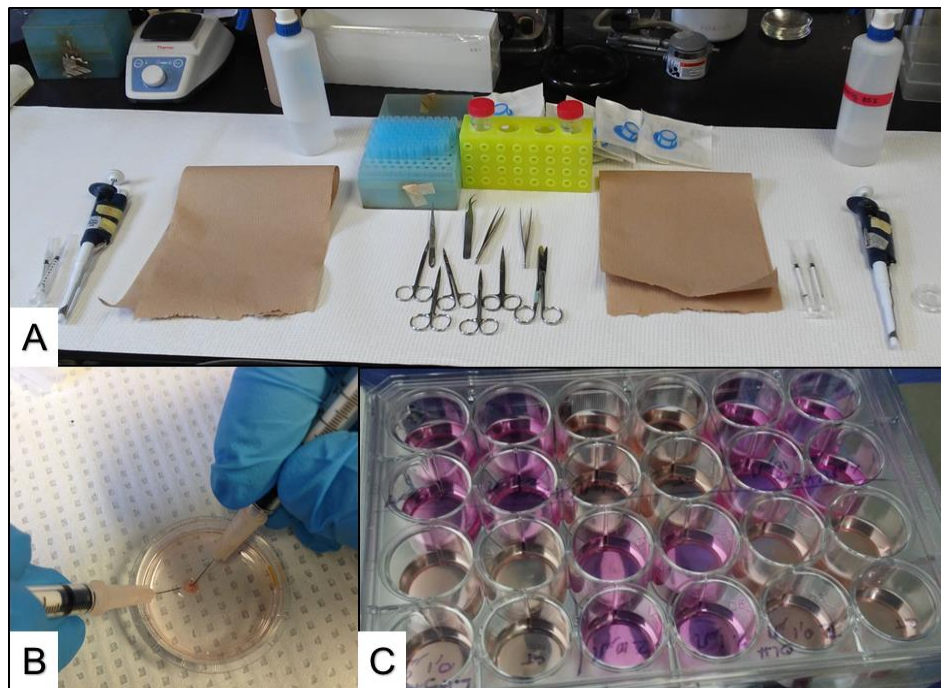


Figura 2 – A Bancada preparada para a obtenção de células da granulosa de camundongos; B: perfuração do ovário em 1ml de meio de cultura com seringas e agulhas de insulina; C: placa de cultura 24 poços já semeada contendo 1ml de meio de cultura rico em células. A diferença na coloração do meio se deu devido ao efeito do hidrossulfeto de sódio em contato com

o meio de cultura, pH foi mensurado e não houve diferença entre os poços tratados e não tratados.

Seguindo todas estas etapas baseadas em experiências anteriores o total de células em 1 ml é em torno de 1 milhão, desta forma, de cada camundongo extrai-se 3 milhões de células. O meio de cultura (DMEM-12 + 5% soro fetal bovino) contendo as células era homogeneizado e semeado em placa de cultura de 24 poços e incubada a 37°C. Após duas horas de cultivo, 100% do meio era trocado por um novo meio adicionado do pré tratamento. O mesmo era feito duas horas mais tarde com adição LH. Passando-se as duas últimas horas de tratamento a placa era virada na pia dispensando-se todo o meio de cultivo. Em cada poço de cultivo eram adicionados 175 µl de buffer β-mecapto-lysis, a placa era fechada e envolta por papel filme para futura extração de RNA e armazenadas em ultra freezer -80°C para evitar a degradação do RNA.

Pode-se também fazer a quantificação de proteínas pela técnica de western blot (WB), porém ao invés de adicionar buffer β-mecapto-lysis adiciona-se Ripa buffer o qual também possui antiproteínase K e antifosfatase, possibilitando-se assim a utilização futura para WB.

2.2.3 Cultivo de folículos

Para o cultivo de folículos também eram utilizados camundongos C57B/6 w-t com idade entre 24 e 26 dias de idade sem nenhuma superestimulação ovariana. Esperava-se que estes animais possuíssem folículos antrais maiores que 300 µm. Nos animais superestimulados os folículos serão mais sensíveis à dissecação e mais escuros.

No primeiro dia do experimento era realizado a eutanásia dos camundongos como já descrito no experimento de cultivo de células da granulosa. Após eutanasiados os dois ovários eram dissecados e postos separadamente em placas de petri pequenas (35 mm de diâmetro) contendo 3 ml de meio de cultivo suplementado com FSH 100 ng. Com a ajuda do estereoscópio (lupa) em aumento de 2,5 x, com uma pinça pequena e uma agulha de insulina 30 gauges com seringa de 1mLa, era feita a limpeza do dos tecidos adjacentes do ovário (Figura 3 e 4). Após limpo o ovário era separado em duas partes iguais e iniciava-se a dissecação.

A metade do ovário era apoiada no centro da placa com aplicação de pressão e segurada para que com a outra mão e suaves movimentos fossem dissecados os grandes folículos (<290 μm), o mesmo era feito com a outra metade. Este processo demandava aproximadamente 40 minutos por ovário. Para obter os melhores folículos muitas vezes eram destruídos os pequenos folículos que os cercavam. Sempre buscava-se obter folículos com a superfície externa livre de outros tecidos ou folículos, pois fragmentos de outros folículos ficavam facilmente aderidos. Porém, deve-se ter muito cuidado para não estourar o folículo de interesse que estava sendo limpo.

Os folículos dissecados eram passados para uma nova placa contendo o mesmo meio e finalmente eram colocados com uma pipeta sobre uma pequena tela (MilliCelli) em outra placa de petri (35 mm) com 2 ml de meio de cultivo previamente suplementado com FSH. Cada folículo era colocado na tela MilliCelli com uma pequena quantidade de meio, assim formando uma pequena gota ao redor do folículo (Figura 3).

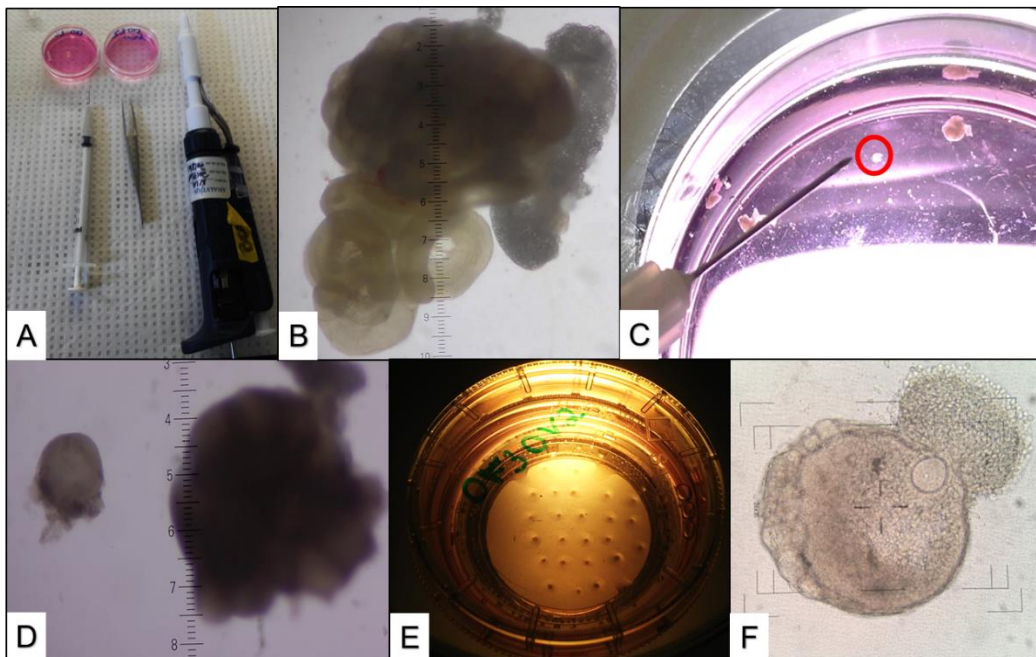


Figura 3 – A: Materiais utilizados para a dissecção (pinça, seringa e agulha) e seleção/transferência dos folículos (pipeta 10 μl); B: Ovário recém dissecado do camundongo com restos uterinos e tecido adiposo. Antes de iniciar o procedimento de dissecção dos folículos estes anexos eram retirados deixando somente o ovário; C: na ponta da agulha visualização macroscópica de um folículo dissecado; D: no canto direito da imagem um folículo dissecado e a esquerda a

metade de um ovário a ser dissecado; E: placa de petri com os folículos dispostos sobre a tela MilliCelli. F: visualização de um folículo ovulado *in-vitro*.

Terminado a transferência para a placa era feito a incubação a 37 °C em estufa com atmosfera controlada pelo no mínimo 23 horas. Nos experimentos desenvolvidos o tempo de cultivo variou entre 23 horas e 40 horas dependendo do objetivo proposto. Antes da realização dos tratamentos que envolviam o projeto, no dia 2 do protocolo era feito uma seleção dos folículos utilizando somente os que estavam íntegros e mais limpos. Feita a seleção era então feito o somatório do total de folículos bons para planejar como seriam os grupos para os tratamentos e os folículos eram redistribuídos nas placas para obter número homogêneo entre os grupos.

No dia 3 eram realizados os tratamentos, o grupo controle era composto somente de meio de cultivo suplementado com FSH, no segundo grupo os folículos foram tratados com 10 ng/ml de HA e no terceiro grupo o tratamento foi realizado com 10 ng/ml de HA e 10ng/ml de NaHS. Após duas horas de cultivo todos os grupos foram tratados com 10 ng/ml de LH para estimular a ovulação. No dia 4 era somente feito avaliação no número de ovulações por grupo.



Figura 4 – Procedimento de dissecção ao estereoscópio.

2.3 Biologia Molecular

Todos os cultivos de células após seu término eram seguidos de análise da expressão gênica. Na Tabela 2 pode ser observado as atividades relacionadas a biologia molecular realizadas.

Tabela 2. Frequência de atividades relacionadas a biologia molecular.

Atividades desenvolvidas	Frequência
Extração de RNA	8
Quantificação de RNA (NanoDrop ND-1000)	8
Transcriptase reversa (Biometra Tpersonal)	8
RT-qPCR	8
Western blot	6
Imunofluorescência	2
Maxi Prep	3



Figura 5 – Equipamento de Real-Time PCR utilizado na rotina do laboratório.

Para extração RNA era utilizado o Pure link™ RNA Mini Kit o qual traz os reagentes praticamente prontos para uso e fácil realização da técnica. Após a extração de RNA era feito a quantificação de RNA nas amostras. Com esse resultado pode-se prosseguir para a próxima etapa de RT ou transcriptase reversa. Para a realização da RT era utilizado o resultado da quantificação de RNA equilibrando a concentração de todas amostras para 250 ng/μl em um

volume de 14 μ l. Além disso, também era adicionado um mix composto de 2 μ l de enzima (transcriptase) e 4 μ l de solução tampão, somando um volume final de 20 μ l de amostra (água + amostra + mix) colocadas no termociclador para a conversão do RNA em cDNA.

Ao término da RT era obtido o cDNA que foi utilizado para a qPCR (Figura 5). O volume final para cada poço da placa também era de 20 μ l. Sendo que 10 μ l era de Mix SYBRGreen, 1,5 μ l de Primer up, 1,5 μ l de Primer down, 1 μ l de MilliQ water e 6 μ l de cDNA.

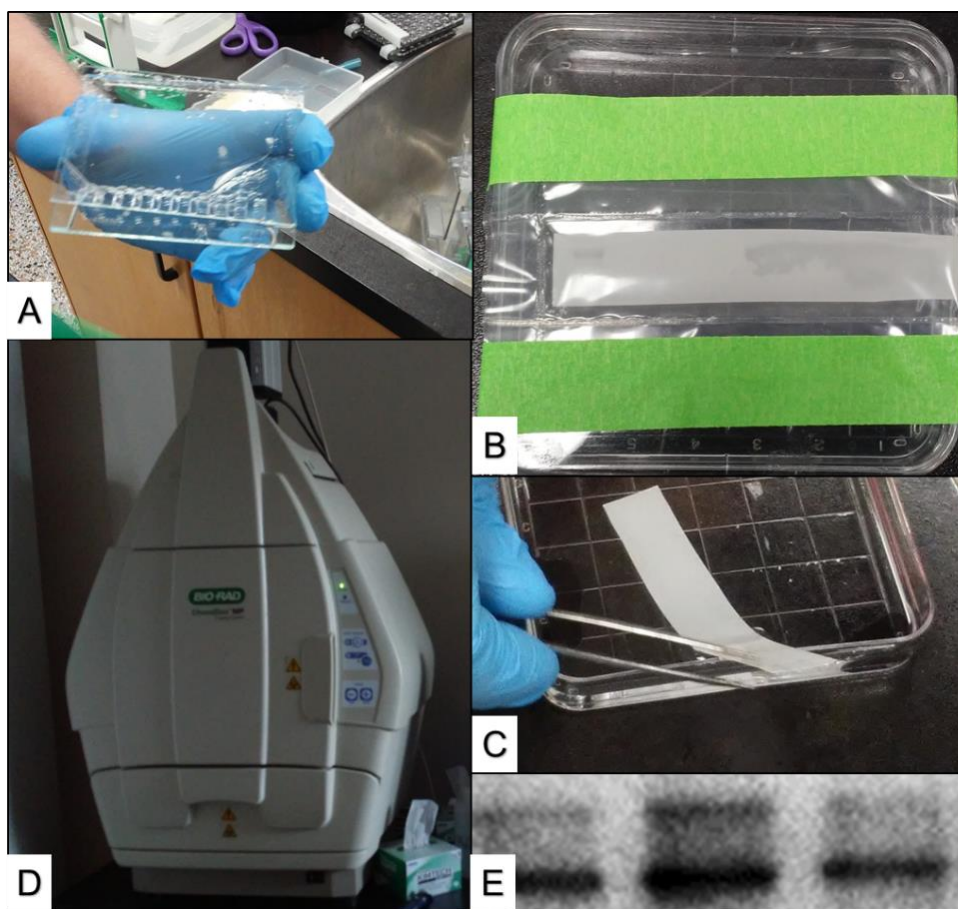


Figura 6 – A: Gel utilizado para transferir proteínas para as membranas demonstradas em B e C; B: Membrana preparada para ser incubada com o anticorpo primário. Para não utilizar uma grande quantidade de anticorpo primário eram preparados pequenos pacotes com a máquina seladora. C: Membrana na placa de lavagem; D: equipamento para revelação por densitometria óptica utilizado na rotina do CRRF; E: imagem obtida após a revelação da membrana.

O western blot foi uma das técnicas que mais ocuparam o tempo durante o estágio por tratar-se de uma técnica laboriosa e que demanda mais tempo para

se obter o resultado. Para obtenção das membranas era preciso primeiramente ser feito a preparação de gel onde eram carregadas as amostras. Após a eletroforese, o gel contendo as amostras era exposto mais uma vez a estimulação elétrica em meio a uma solução específica (transfer buffer) para transferir a amostra do gel para a membrana. Obtida a membrana ela era primeiramente incubada com anticorpo primário (diluído em TTBS + 5% BSA) durante a noite. No dia seguinte era feito a lavagem das membranas com solução TTBS e as membranas eram novamente incubadas, mas desta vez com o anticorpo secundário (TTBS + 5% leite). Após o período de incubação normalmente em torno de 1 a 2 horas as membranas foram lavadas novamente.

Após a lavagem das membranas com TTBS era preparada a solução Clarity™ que é utilizada para a revelação por densitometria óptica através do aparelho ChemiDoc™ MP (Figura 6).

As imunofluorescências foram referentes a conclusão de projeto de um dos estudantes de pós doutorado. O protocolo era semelhante ao desempenhado no laboratório de patologia veterinária – UFSC com exceção do aparato (Figura 7) utilizado para o bloqueio das enzimas endógenas. Após a preparação das lâminas as mesmas eram visualizadas ao microscópico de fluorescência e capturado as imagens (Figura 7).

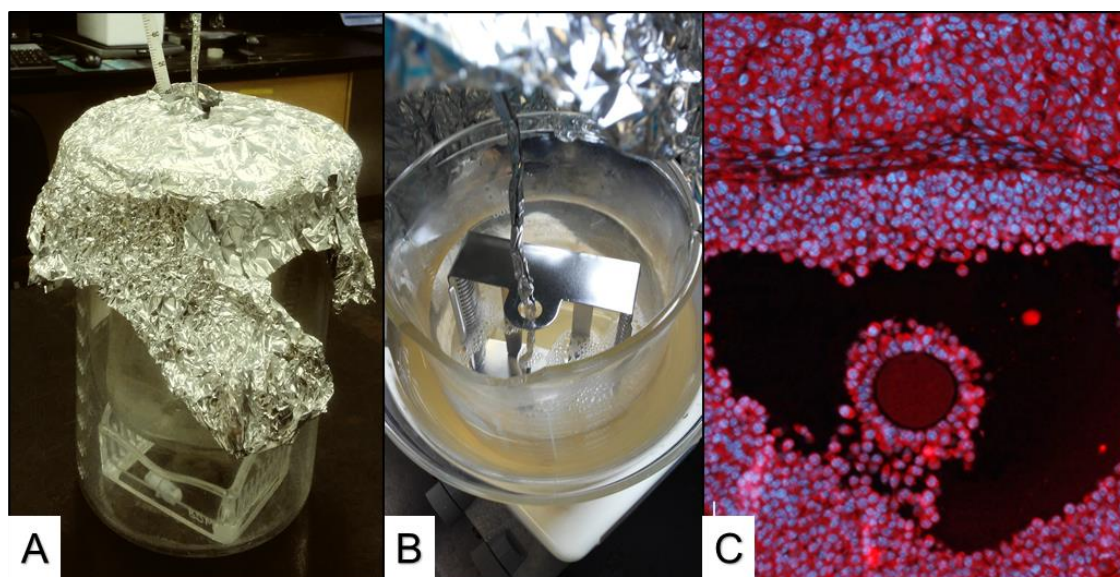


Figura 7 – A e B aparato utilizado na reação de bloqueio das enzimas endógenas; C: imagem capturadas de umas das imunofluorescências realizadas durante o estágio.

2.4 Outras atividades

Durante o estágio também foram acompanhadas outras atividades descritas nas tabelas 3 e 4 relacionadas ao dia-dia do laboratório e a área acadêmica.

Tabela 3. Frequência de atividades relacionadas a vivência acadêmica

Atividades desenvolvidas	Frequência
Discussão de artigos	4
Seminários e debates	4
Eventos do laboratório (Simpósio e reunião anual)	2
Curso de biologia reprodutiva	5

A cada duas semanas haviam reuniões do laboratório com discussão de artigo científicos, na qual era dado uma nota para cada artigo e também levantado todos os pontos fortes e falhas do trabalho. Além disso, uma vez ao mês haviam discussões e debates mediados pelos estudantes da pós-graduação do CRRF. Outras atividades como Wip (reunião anual do cento de pesquisa CRRF) e curso de biologia reprodutiva também contaram com a participação. O curso de biologia reprodutiva traz professores de outras Universidades participantes do RQR (Réseau Québécois en reproduction) como McGill University para ministrar palestras e oferecer um intercâmbio de conhecimento entre as cidades.

Tabela 4. Frequência de atividades relacionadas a rotina diária do laboratório

Outras atividades	Frequência
Diluição de primers	2
Preparação de soluções de trabalho e estoque (TBS, Transfer buffer, solução salina, PBS, etc.)	diariamente

3 CONCLUSÃO

Após todos os anos de estudos acadêmicos o estágio curricular traz ao aluno a oportunidade de imersão em prática e conhecimento na área de afinidade de sua escolha. O estágio é um processo fundamental para construção do estudante e prepara-lo melhor para o mercado trabalho.

Durante o estágio pode-se perceber com maior intensidade quão grande é o interesse em melhorar os índices produtivos na criação de animais. Cada dia tem-se novas descobertas em experiências rotineiras, porém a cada dia também um novo desafio aparece no campo. Este desafio vem principalmente na forma de prejuízos ao produtores e empresas. Para evitar isso novos projetos são financiados para continuar respondendo diversas questões e problemas científicos e trazer melhorias ao setor de produção animal.

O estágio em biologia reprodutiva proporcionou adentrar em complexos campos da pesquisa em endocrinologia e fisiologia da reprodução. Através da investigação em pesquisa de ciência básica ao mesmo tempo que foi colocado em prática conhecimentos aprendidos durante a graduação, foi adquirido também incontáveis experiências e novos aprendizados que serão levados para vida pessoal e principalmente na construção da carreira profissional.

4 REFERÊNCIAS

FEELISCH, M.; OLSON, K. Embracing sulfide and CO to understand nitric oxide biology. **Nitric Oxide**. 2013.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Evolution of the fgf and fgfr gene families. **Trends Genet**, v. 20, n. 11, p. 563-9, Nov 2004.

KATOH, Y.; KATOH, M. Comparative genomics on FGF7, FGF10, FGF22 orthologs, and identification of fgf25. **International Journal of Molecular Medicine** October, 2005.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO/ CONSELHO NACIONAL DE EDUCAÇÃO, Parecer CNE/CES 105/2002 – HOMOLOGADO, Despacho do Ministro em 9/4/2002, publicado no Diário Oficial da União de 11/4/2002, Seção 1, p. 14, 2002.