



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ALESSANDRA MARTINS DA COSTA

**SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA E O PERFIL DE MUCINAS NO
OVIDUTO BOVINO**

Presidente Prudente - SP
2023

ALESSANDRA MARTINS DA COSTA

**SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA E O PERFIL DE MUCINAS NO
OVIDUTO BOVINO**

Defesa apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho

636.089
H663e

Costa, Alessandra Martins da.
Superestimulação ovariana e o perfil de mucinas no
oviduto bovino / Alessandra Martins da Costa. –
Presidente Prudente, 2023.
39 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

Orientador: Anthony César de Souza Castilho.

1. Bovino. 2. Estradiol. 3. FSH/eCG. 4. Mucinas.
I. Título.

ALESSANDRA MARTINS DA COSTA

**SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA E O PERFIL DE MUCINAS NO
OVIDUTO BOVINO**

Defesa apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 26 de abril de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra Rubia Bueno da Silva
Centro Universitário Sudoeste Paulista – UniFSP
Avaré-SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus, meu porto seguro, amigo fiel, presença constante em minha trajetória, meu grande conselheiro, que me permitiu a sabedoria e força para vencer mais essa etapa da minha vida, e a minha família que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desse trabalho define o final de uma importante etapa entre tantas que formam nossa trajetória na vida e, como nas demais, foram muitas as pessoas que contribuíram para que o objetivo fosse alcançado, dentre os quais destacam-se:

Meu esposo, meus filhos, minhas noras, minha amiga Lidelci, pessoas especiais que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando.

Aos meus amigos (as) e companheiros (as) Alan Giroto, Sarah Nunes, Ana Paula e todo time Biotera, obrigada pelo carinho e dedicação de vocês, por muitas vezes, deixando de lado seus momentos de descanso para me ajudar e me orientar, gratidão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho por acreditar no meu trabalho e pela compreensão e conselhos durante todo esse período.

A Universidade do Oeste Paulista, Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação, pelo apoio financeiro. A todos que, de alguma maneira, colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse alcançar essa conquista.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:09

RESUMO

Superestimulação ovariana e o perfil de mucinas no oviduto bovino

O oviduto é o local onde ocorrem a capacitação espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial. Durante o ciclo estral, as alterações no oviduto são moduladas principalmente pelos hormônios estradiol (E2) e progesterona (P4). Enquanto o E2 estimula a proliferação e hipertrofia das células secretoras, a P4 tem o efeito contrário, causando a atrofia e redução da secreção celular. Além disso, esses hormônios estão relacionados as alterações no fluido ovidutal ao longo do ciclo reprodutivo de fêmeas bovinas. A superestimulação ovariana (SEOv) possibilita o aumento dos índices reprodutivos em fêmeas bovinas, maior intensidade de seleção, diminuição do intervalo entre gerações, maior disponibilidade de animais para reposição e, além disso, também permite que uma fêmea de elevado padrão zootécnico fosse utilizada de uma forma mais racional, fornecendo um grande número de descendentes, num curto espaço de tempo. Nesse contexto, há evidências de que a superestimulação ovariana (SEOv) aumenta os níveis de E2 no tecido ovidutal em bovinos. Os níveis de E2 no tecido ovidutal de bovinos e as mucinas presentes desempenham papéis importantes na fisiologia reprodutiva desses animais. Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o impacto da SEOv com FSH ou FSH/eCG na regulação da produção de mucinas presentes no oviduto. Para tanto, vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) foram submetidas à SEOv utilizando FSH (n=5), FSH/eCG (n=5) ou sincronizadas (grupo controle, n=5). As vacas em um estágio aleatório do ciclo estral, receberam uma inserção vaginal liberadora de progesterona (1,0 g) e benzoato de estradiol (2,5 mg, i.m.) no dia 0. As vacas submetidas à SEOv usando o protocolo FSH e FSH/eCG receberam administração de FSH duas vezes ao dia, dos dias 5 a 8. No protocolo FSH/eCG, as duas últimas doses de FSH (Dia 8) foram substituídas por duas doses de eCG (dose total = 400 UI, i.m.). No dia 7, todas as vacas receberam 150 mg de d-cloprostenol i.m. duas vezes/dia. No dia 8, as inserções vaginais liberadoras de progesterona foram removidas e as vacas foram abatidas. Após o abate, os ovidutos (ampola e istmo) foram coletados, fixados e submetidos ao processamento histológico para a coloração Alcian blue e quantificação da abundância de mRNA de mucina 9 (MUC9). Os segmentos da ampola e istmo foram analisados separadamente e o efeito da SEOv foi investigado por ANOVA paramétrica e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Em suma, o tratamento superestimulatório de FSH combinado ao eCG aumentou a abundância de mucinas totais no istmo ($p < 0,05$) e na ampola ($p < 0,05$). Adicionalmente, a SEOv, independente do tratamento, incrementou abundância relativa do gene que codifica a mucina 9, apenas na ampola ($p < 0,05$). Em conclusão, a SEOv utilizando FSH combinado ao eCG determina um incremento na expressão e secreção de mucinas no oviduto bovino.

Palavras-chave: FSH/eCG, estradiol, oviduto, mucinas, bovinos.

ABSTRACT

Ovarian superstimulation and the profile of mucins in the bovine oviduct

The oviduct is the site where sperm capacitation, fertilization and early embryonic development take place. During the estrous cycle, changes in the oviduct are mainly modulated by the hormones estradiol (E2) and progesterone (P4). While E2 stimulates proliferation and hypertrophy of secretory cells, P4 has the opposite effect, causing atrophy and reduction of cell secretion. In addition, these hormones are related to changes in the oviductal fluid throughout the reproductive cycle of bovine females. Ovarian superstimulation (SEOv) enables increased reproductive rates in bovine females, greater selection intensity, reduced generation interval, greater availability of animals for replacement and, in addition, also allows a female with a high zootechnical standard to be used in a variety of ways. a more rational way, providing a large number of descendants in a short time. In this context, there is evidence that ovarian superstimulation (vSEO) increases E2 levels in oviductal tissue in cattle. E2 levels in bovine oviductal tissue and the mucins present play important roles in the reproductive physiology of these animals. Within this context, the aim of this study was to investigate the impact of SEOv with FSH or FSH/eCG in regulating the production of mucins present in the oviduct. Therefore, Nelore cows (*Bos taurus indicus*) were submitted to SEOv using FSH (n=5), FSH/eCG (n=5) or synchronized (control group, n=5). Cows at a random stage of the estrous cycle received a progesterone-releasing vaginal insert (1.0 g) and estradiol benzoate (2.5 mg, i.m.) on day 0. Cows underwent vSEO using the FSH and FSH protocol /eCG received FSH administration twice daily from days 5 to 8. In the FSH/eCG protocol, the last two doses of FSH (Day 8) were replaced by two doses of eCG (total dose = 400 IU, i.m.). On day 7, all cows received 150 mg of d-cloprostenol i.m. twice/day. On day 8, the progesterone-releasing vaginal inserts were removed and the cows were slaughtered. After slaughter, the oviducts (ampulla and isthmus) were collected, fixed and subjected to histological processing for Alcian blue staining and quantification of mucin 9 mRNA abundance (MUC9). Ampullary and isthmus segments were analyzed separately and the effect of SEOv was investigated by parametric ANOVA and means were compared by Tukey-Kramer test. Data are presented as means \pm S.E.M. Differences were considered significant when $P < 0.05$. In summary, superstimulatory FSH treatment combined with eCG increased the abundance of total mucins in the isthmus ($p < 0.05$) and ampulla ($p < 0.05$). Additionally, SEOv, regardless of treatment, increased the relative abundance of the gene that encodes mucin 9, only in the ampoule ($p < 0.05$). In conclusion, SEOv using FSH combined with eCG determines an increase in the expression and secretion of mucins in the bovine oviduct.

Keywords: FSH/eCG, estradiol, oviduct, mucins, cattle.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ARTIGO CIENTÍFICO..... | 10 |
| | ANEXO A- NORMAS DA REVISTA ANIMAL REPRODUCTION..... | 26 |

1 ARTIGO CIENTÍFICO

1 Revista Animal Reproduction

2 **Superestimulação ovariana e o perfil de mucinas no oviduto bovino**

3 Alessandra Martins da Costa¹ (<https://orcid.org/0000-0002-8575-130X>), Ana Paula
4 Marques Andrade¹ (<https://orcid.org/0000-0003-0297-3677>), Sarah Nunes²
5 (<https://orcid.org/0000-0002-7957-1660>), Alan Giroto¹ (<https://orcid.org/0000-0001-5963-5930>), Anthony César de Souza Castilho^{1*} (<https://orcid.org/0000-0003-1666-7021>)
7

8 1 University of Western São Paulo (Unoeste), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

9 2 University of São Paulo States (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

10 * Correspondence: Anthony César de Souza Castilho. castilho.anthony@gmail.com.
11 University of Western São Paulo, Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro
12 CEP, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brazil.

13 **Resumo**

14 As alterações durante o ciclo estral no oviduto são moduladas principalmente pelos
15 hormônios estradiol (E2) e progesterona (P4). Além disso, esses hormônios estão
16 relacionados a alterações no fluido ovidutal ao longo do ciclo reprodutivo de fêmeas
17 bovinas. Nesse contexto, há evidências de que a superestimulação ovariana (SEOv)
18 aumenta os níveis de E2 no tecido ovidutal em bovinos. Assim, o objetivo deste estudo
19 foi investigar o impacto do SEOv com FSH ou FSH/eCG na regulação das mucinas
20 presentes no oviduto. Após o abate, os ovidutos (ampola e istmo) foram coletados,
21 fixados e submetidos ao processamento histológico para coloração com Alcian Blue e
22 quantificação da abundância de mRNA de mucina 9 (MUC9). Em resumo, descobrimos
23 que o tratamento superestimulatório usando FSH combinado com eCG aumentou as
24 mucinas totais no istmo ($p<0,05$) e na ampola ($p<0,05$). Além disso, a abordagem SEOv
25 aumentou a abundância relativa do gene que codifica a mucina 9, apenas na ampola
26 ($p<0,05$). Em resumo, SEOv utilizando FSH combinado com eCG determina aumento
27 da expressão e secreção de mucinas no oviduto bovino.

28

29 **Palavras-chave:** FSH/eCG, estradiol, oviduto, mucinas, bovinos.

30

31 **Introdução**

32 Em espécies monovulatórias, incluindo bovinos, a superestimulação ovariana
33 (SEOv) é uma forma de obter muitos oócitos por ciclo estral de um animal específico.
34 Esses oócitos podem gerar embriões que serão transferidos para o útero de outras vacas
35 (nomeadas receptoras). O processo de coleta/transferência geralmente é executado entre
36 os dias 6 e 8 após o estro, o que significa que todos os eventos desde o transporte dos

37 gametas até o início do desenvolvimento embrionário ocorrem no lúmen do oviduto (1).
38 É importante ressaltar que todas essas funções podem ainda sofrer mudanças
39 morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e endócrinas durante o ciclo estral dos bovinos,
40 uma vez que o estradiol (E2) e progesterona (P4) são os principais fatores que modulam
41 a morfologia do oviduto bovino (2).

42 Com o propósito de se aproveitar melhor a capacidade reprodutiva de animais
43 geneticamente superiores e conhecendo-se mais a fisiologia ovariana, esses protocolos
44 hormonais desenvolvidos possibilitam a ovulação múltipla seguida da transferência de
45 embriões (3). Dentre os protocolos de SEOv destaca-se o uso de altas doses de
46 gonadotrofinas, como FSH e gonadotrofina coriônica equina (eCG) (4). Sendo que a
47 substituição das duas últimas doses de FSH por eCG (protocolo FSH/eCG)
48 apresentaram melhora na eficiência reprodutiva em vacas Nelore (5). Além disso,
49 protocolo FSH/eCG em vacas Nelore aumenta os níveis de E2 ovidutal e influencia
50 positivamente o perfil transcricional de receptores de esteroides (ESR1 e PGR) e genes
51 relacionados à fertilização (FUCA1, FUCA2, OVGP1 e HSPA5), aumentando a
52 eficiência e a taxa de sucesso da reprodução bovina. No entanto, as alterações causadas
53 pelo SEOv na composição do fluido ovidutal não são completamente elucidadas (6).

54 A superfície luminal do trato reprodutivo é coberta por vários tipos de mucinas
55 que desempenham um papel fundamental no oviduto, contribuindo para a fisiologia
56 reprodutiva e a fertilização dos mamíferos (7). São glicoproteínas de elevada massa
57 molecular fortemente glicosiladas produzidas por tecidos epiteliais. Elas são expressas
58 de forma específica para cada tecido, nas superfícies da mucosa atuam como um
59 lubrificante, bem como uma barreira, protegendo as células de desidratação, proteólise e
60 infecção (8). De acordo com os aspectos estruturais e rotas biossintéticas, existem duas

61 classes amplas de mucinas atualmente conhecidas; as mucinas associadas à membrana e
62 as secretadas (9).

63 Para avaliação da função específica das mucinas no processo de implantação, foi
64 realizada uma análise sistêmica da expressão de mucina no oviduto e no útero de
65 camundongos, o estudo demonstrou mRNAs codificados por 6 diferentes genes de
66 mucinas, tais como; *MUC1*, *MUC2*, *MUC3*, *MUC4*, *MUC5* e *MUC9* também conhecida
67 como *OVGP1* (7). Além disso, a detecção e análises dessas proteínas demonstram que
68 elas apresentam uma distribuição temporal e espacial de macromoléculas e diferenças
69 na distribuição de proteínas entre as espécies; enquanto a *MUC9*, ou ovidutina, parece
70 ser restrita ao oviduto (10).

71 Diversos estudos têm relatado que a *MUC9* é estimulada pelo hormônio E2
72 durante o período periovulatório.

73 Dentro desse contexto, baseando-se nas premissas de que a SEOv é capaz de
74 promover aumento da expressão de RNAs transcritos em regiões específicas do oviduto
75 (infundíbulo, ampola e istmo), no papel dos esteroides ovarianos na produção de
76 proteínas envolvidas em diversos eventos biológicos importantes para o funcionamento
77 do oviduto bovino (11); e que pouco se sabe sobre os mecanismos que promovem e
78 controlam a regulação da expressão das mucinas nesses tecidos, justifica-se a realização
79 do presente estudo. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar o impacto da
80 SEOv com FSH ou FSH/eCG na regulação da produção de mucinas presentes no
81 oviduto.

82

83 **Métodos**

84 **Local de desenvolvimento dos experimentos**

85 Este estudo foi realizado em uma fazenda localizada no município de Santa Cruz
86 do Rio Pardo (São Paulo, Brasil; latitude 22° 53 '56"; longitude 49° 37 '57"; altitude
87 467 m). Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados
88 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da Universidade do
89 Estado de São Paulo (IBB / UNESP - CEUA, número 379). O protocolo estava de
90 acordo com os princípios éticos em animais pesquisa.

91

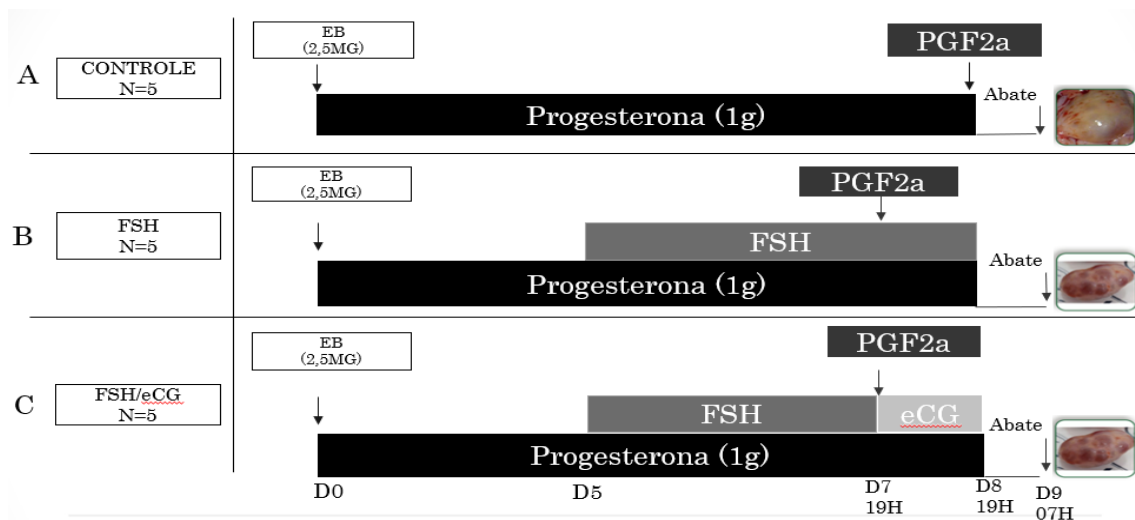
92 **Grupos experimentais e protocolos de SEOv**

93

94 Vacas nelores (*Bos taurus indicus*) multíparas não lactantes de 5 a 7 anos de
95 idade com escore de condição corporal variando de 2,0 a 3,5 foram mantidas em
96 pastagem (*Brachiaria brizantha*) com acesso livre à água e suplementação mineral. No
97 Grupo A, o controle das vacas não foi submetido a qualquer protocolo
98 superestimulatório (Controle n = 5); outras vacas foram submetidas aos protocolos de
99 SEOv: o Grupo B com FSH (n=5) e o Grupo C com FSH/eCG (n=5) (Figura 1).

100 Todas as vacas em um estágio aleatório do ciclo estral receberam uma inserção
101 vaginal liberadora de progesterona (1,0 g, Primer[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) e
102 benzoato de estradiol (2,5 mg, i.m., Estrogin[®], Farmavet, São Paulo, Brasil) no dia 0. As
103 vacas submetidas à SEOv usando o protocolo FSH receberam administração de pFSH
104 (Folltropin-V[®] 84, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canadá) duas vezes ao dia,
105 dos dias 5 ao 8; um total de 200 mg foi aplicado com uma diminuição do regime das
106 doses: 40% no dia 5, 30% no dia 6, 20% no dia 7 e 10% no dia 8. Para o protocolo
107 FSH/eCG, as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas doses de eCG
108 (total dose = 400 UI, Novormon[®], Syntex, Buenos Aires, Argentina). Todos as vacas
109 receberam 150 mg de d-cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec, São Paulo, SP, Brasil) duas
110 vezes no dia 7 (7h e 19h). As inserções vaginais que liberam progesterona foram
111 removidas às 19h, no dia 8 e as vacas foram abatidas às 7 h do dia 9.

112



113

114 Figura 1 - Desenho experimental. (A): grupo controle (animais sincronizados, n=5), protocolo hormonal
 115 para vacas não submetidas a SEOv. (B): grupo FSH (n = 5), protocolo hormonal para vacas submetidas a
 116 SEOv com o uso de FSH. (C): grupo FSH/eCG (n = 5), protocolo hormonal para vacas submetidas a
 117 SEOv utilizando o FSH combinado com eCG. Todas as vacas foram abatidas no dia 9 às 7h e os tratos
 118 reprodutivos foram imediatamente transportados para o laboratório.

119

120 Foram identificados múltiplos folículos pré-ovulatórios nos ovários dos animais
 121 do grupo SEOv e um folículo pré-ovulatório nos animais do grupo controle.

122 De modo geral, o estabelecimento da SEOv foi previamente detectado por
 123 ultrassonografia ovariana realizada 12 horas antes do abate. Além disso, as amostras
 124 sanguíneas coletadas da veia jugular no dia 8 (19h) e dia 9 (7h) para quantificar a
 125 concentração plasmática de LH e garantir que nenhuma vaca tenha sofrido um aumento
 126 endógeno de LH. Após o abate, o diâmetro dos folículos em todas as vacas variou de 11
 127 a 14 milímetros. O número total de folículos superestimulados foi em torno de 20
 128 folículos e não diferiu entre os protocolos de FSH e FSH/eCG (11).

129

130 **Processamento histológico e quantificação das mucinas**

131 Os tratos reprodutivos foram transportados do abatedouro para o laboratório em
 132 solução salina (0,9%) a 4 °C imediatamente após o abate das vacas. O oviduto ipsilateral
 133 ao ovário com o folículo pré-ovulatório do grupo controle e um oviduto aleatório para o

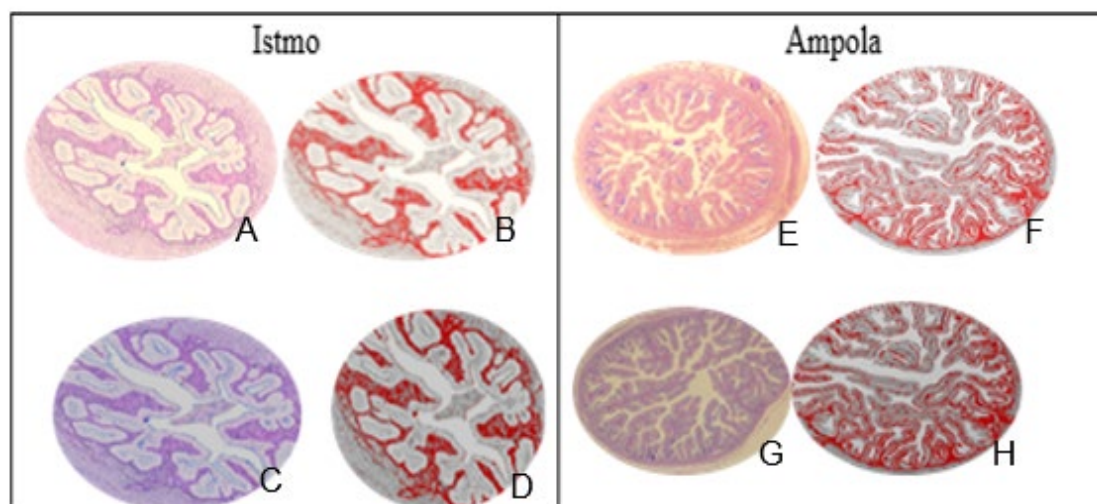
134 grupo SEOv, foram isolados e o tecido conjuntivo circundante foi cortado. Cada
135 segmento do oviduto foi analisado separadamente (ampola e istmo) e as regiões de
136 transição foram descartadas. Os tecidos foram fixados em paraformaldeído 4% por 24
137 horas em temperatura ambiente e armazenados em etanol 70% a 4 °C. Posteriormente,
138 as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol sequencial e
139 incluídas em Paraplast (Oxford Labware, St. Louis, MO, EUA). Cortes de 4 µm de
140 espessura foram obtidos e corados com o azul de Alcian (AB) para quantificação das
141 mucinas ácidas.

142 As imagens foram capturadas com um fotomicroscópio digital Axiophot II
143 (Zeiss Jenaval, Jena, Alemanha) ao longo de todo corte histológico e selecionamos um
144 total de 44 figuras, sendo, 19 fotos por amostra para a ampola e 25 para o istmo.
145 Amostras sem camada muscular intacta ou com artefatos que prejudicassem a análise do
146 material foram descartadas. Todas as análises foram realizadas com o software ImageJ
147 (versão 1.51 23 de abril de 2018, disponível gratuitamente:
148 <<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>>), seguindo as instruções do software para
149 quantificação de mucinas ácidas.

150 Em resumo, utilizando o software ImageJ por meio de histogramas coloridos no
151 sistema RGB, foi determinada a intensidade da cor em número de pixels em cada campo
152 selecionado e os dados finais foram transformados e expressos em porcentagem por
153 campos analisados. As áreas das mucinas foram selecionadas e um padrão de valor de
154 Threshold foi determinado para todas as imagens. O valor final obtido do ImageJ
155 demonstra a porcentagem de pixels na imagem (Area Fraction), representando a
156 porcentagem de mucinas ácidas em uma determinada área, que foi então utilizada para
157 análise estatística (Figura 2)

158

159



160
 161 Figura 2 - Processamento histológico. histograma colorido no sistema RGB intensidade da cor em nº de
 162 pixels demonstrando a % de mucinas presentes em determinada área. (A): istmo do grupo controle. (B):
 163 istmo grupo controle e a % de mucinas presentes. (C): istmo do grupo FSH/eCG. (D): istmo do grupo
 164 FSH/eCG e a % de mucinas presentes. (E): ampola do grupo controle. (F): ampola do grupo controle e a
 165 % de mucinas presentes. (G): ampola grupo FSH/eCG. (H): ampola grupo FSH/eCG e a % de mucinas
 166 presentes.

167

168 **Extração do RNA e RT-qPCR**

169 As amostras de ovidutos (n=5/grupo experimental) foram colocadas em
 170 TRIzol® (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e homogeneizado com um Polytron®
 171 homogeneizador (Ultraturrax, Luzern, Suíça). O RNA total foi extraído de acordo com
 172 o protocolo do fabricante e armazenado em -80 °C. As concentrações de RNA foram
 173 quantificadas usando um espectrofotômetro (Nanodrop; Thermo Fisher Scientific,
 174 Waltham, MA). O RNA total (1µg) de cada amostra foi incubado com DNase I
 175 (Invitrogen) e, em seguida, transcrito reversamente com SuperScript® III (Invitrogen)
 176 usando primers Oligo-d (T), seguindo as instruções do fabricante. O DNA
 177 complementar obtido foi diluído oito vezes e armazenado a -20 °C e a abundância
 178 relativa foi avaliada por qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) usando
 179 StepOne Plus® (Life Technologies, Carlsbad, CA) com o Power SYBR® Green PCR
 180 Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA).

181 Para tanto, oligonucleotídeos iniciadores foram projetados usando sequências
 182 específicas de bovinos (Tabela 1). As reações foram otimizadas pela diluição do primer
 183 e uma temperatura de anelamento para atingir a eficiência máxima de amplificação para
 184 cada gene (90-110%). O volume da reação foi de 25 μ l com 1,5 μ l de cada primers e 1
 185 μ l de amostra. Condições de ciclagem de PCR foram 95 °C por 10 min, seguido por 40
 186 ciclos de 95 °C por 10 s, e extensão por 1 min em temperatura específica para cada gene
 187 (Tabela 1). Cada amostra e o controle negativo foram analisados em duplicatas.

188 Para selecionar genes de referência, foi usado o software GeNorm, Normfinder
 189 para avaliar a estabilidade do gene. A expressão relativa dos genes alvo foi calculada a
 190 partir da média geométrica dos genes de referência mais estáveis (*18S* e *H2A*), a partir
 191 do método $\Delta\Delta 2CT$ (12).

192

193 Tabela 1 - Detalhes dos primers usados em RT-qPCR.

194

| Gene | Forward sequence (5'-3') | Reverse sequence (5'-3') | Final concentration (mM) | Temp. annealing (°C) |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| <i>18S</i> | AGAAACGGCTACCACATCCAA | CCTGTATTGTTATTTTCGTCACCT | 200 | 60 |
| <i>H2A</i> | GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG | TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC | 300 | 60 |
| <i>MUC9</i> | GTCGTCCAGAAAGCGTATGA | CAGAGAGAACAGAGGGCTATTG | 300 | 60 |

195

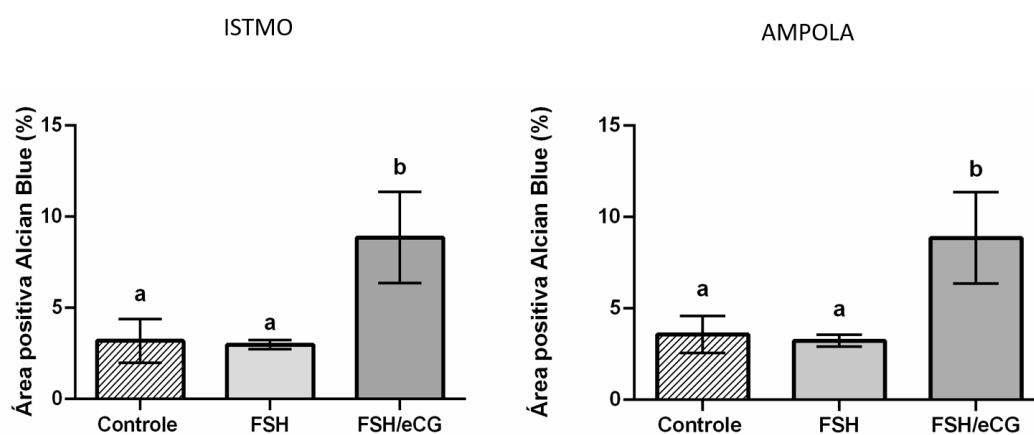
196 **Análise estatística**

197 O efeito da superestimulação ovariana sobre a quantificação de mucinas ácidas pelo
 198 método coloração *Alcian Blue* no oviduto bovino e abundância de mRNA do gene alvo
 199 foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. O efeito da SEOv foi
 200 testado por One-way ANOVA paramétrica. As médias foram comparadas pelo teste de
 201 Tukey-Kramer. Os dados são apresentados como médias \pm S.E.M. As diferenças foram
 202 consideradas significativas quando $P < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o
 203 software JMP[®] (SAS).

204

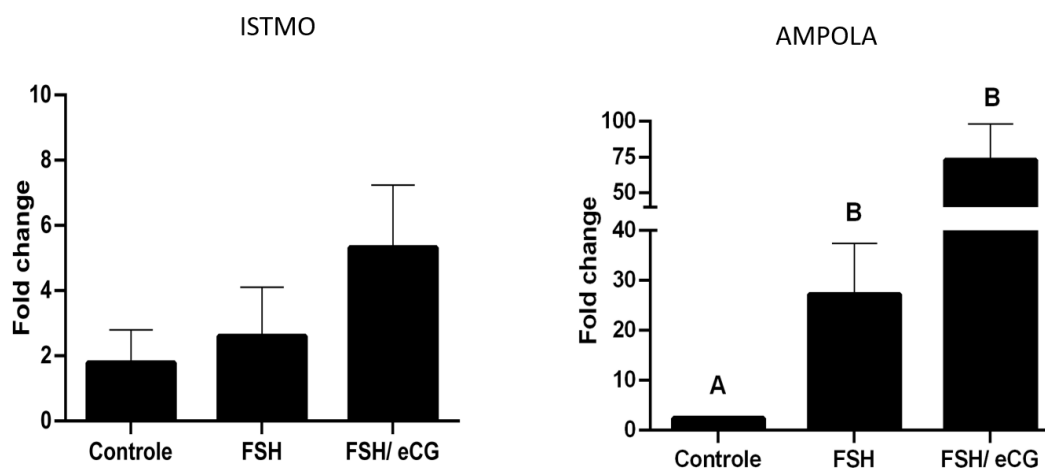
205 **Resultados**

206 Nossos achados demonstram que o tratamento superestimulatório de FSH
 207 combinado com eCG aumentou a abundância de mucinas totais no istmo e na ampola
 208 ($p < 0,05$; Figura 1). Adicionalmente, a SEOv, independente do tratamento, incrementou
 209 abundância relativa do gene que codifica a mucina 9, apenas na ampola ($p < 0,05$: figura
 210 2).



211

212 Figura 3 - Efeito da superestimulação ovariana na quantificação de mucinas no istmo e ampola de
 213 bovinos utilizando a coloração Alcian Blue. A análise estatística foi realizada por ANOVA paramétrica e
 214 as médias comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M.
 215 Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).



216 Figura 4 - Abundância relativa do gene MUC9 na ampola. Os dados são apresentados como média dos
 217 níveis relativos de mRNA (gene alvo/média geométrica dos genes de referência, 18S e H2A). A análise
 218 estatística foi realizada por ANOVA paramétrica e as médias comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. Os
 219 dados são apresentados como média \pm E.P.M. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).
 220

221

222 **Discussão**

223 No presente trabalho demonstramos o impacto da SEOv no oviduto bovino
224 submetido ao protocolo utilizando FSH e FSH/eCG sobre quantificação de mucinas na
225 ampola e istmo. É importante destacar que o oviduto desempenha funções específicas
226 na maturação dos gametas, fertilização e no desenvolvimento embrionário inicial.
227 Durante esses processos, o fluido ovidutal desempenha um papel fundamental. O fluido
228 ovidutal tem uma composição complexa (13,14) consistindo principalmente de
229 transudato de plasma e derivados do epitélio secretor (15) e somado aos nossos achados
230 demonstra como os protocolos superestimulatórios modificam o ambiente ovidutal.

231 Alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas durante ciclo estral em
232 vacas demonstram que os hormônios esteroides, estradiol (E2) e progesterona (P4), são
233 os principais fatores que controlam as alterações no oviduto (1). De fato, no modelo de
234 fêmeas de camundongos ovariectomizadas a expressão de mucinas se demonstrou ser
235 regular pela função ovariana (10). No nosso estudo, o aumento da secreção de mucinas
236 totais na ampola e istmo promovido pelo tratamento do protocolo FSH/eCG, pode em
237 partes estar relacionado ao aumento dos níveis séricos de estradiol presentes em vacas
238 submetidas a esse protocolo superestimulatório, como confirmado no trabalho do nosso
239 grupo (17). Mudanças temporais nas concentrações de esteroides durante o ciclo estral
240 induzem a modulação do perfil transcricional oviductal (1,18,19). Geralmente, a
241 atividade do E2 está associada à estimulação de células secretoras do oviduto e
242 proliferação celular, enquanto P4 exibe um efeito supressor (1,20). O efeito estimulador
243 de E2 na secreção de fluido do oviduto (21) resulta na produção do maior volume de
244 fluido pelo oviduto durante o estro (22), o que corrobora com nossos dados

245 anteriormente publicados demonstrando aumento nos níveis ovidutais de E2 em vacas
246 submetidas ao protocolo FSH/eCG (6).

247 Adicionalmente, proteínas como a MUC9 têm sido associada com
248 espermatozoides e/ou complexos cumulus-oócitos (25–27). Atuando na polispermia
249 controle endurecendo a zona pelúcida antes da fertilização (26,28) e modulação da zona
250 pelúcida do esperma, indicando um papel ativo no oviduto durante o processo de
251 fertilização (26,29,30), estabelecendo assim, um mecanismo pelo qual níveis mais altos
252 de E2 regulem genes ovidutais para garantir o sucesso da fertilização de ovócitos
253 múltiplos em vacas superestimuladas.

254 Vários autores (6,10,13,18,23,24) relataram que MUC9 é estimulado por E2
255 durante o período periovulatório. Em nosso estudo, o aumento dos níveis de E2 pode
256 estar relacionado ao aumento da expressão da MUC9 (mRNA e proteína) na ampola das
257 vacas submetidas ao FSH/eCG protocolo. Este último resultado concorda com os
258 achados de outros estudos mostrando que cada região ovidutal respondeu de forma
259 diferente à estimulação por E2, e que a transcrição no istmo não muda sob tratamento
260 com estradiol (23). Considerando que o protocolo FSH/eCG resulta em níveis
261 aumentados de E2 no fluido folicular e ovidutal (6,17), propomos um mecanismo pelo
262 qual níveis mais altos de E2 regula a expressão de mucinas para garantir o sucesso da
263 fertilização de múltiplos oócitos em vacas superestimuladas.

264

265 **Conclusão**

266 Concluimos que a SEOv usando FSH combinado com eCG aumenta a produção de
267 mucinas na ampola e istmo; e em partes, esse aumento está relacionado ao perfil de
268 transcrição da mucina 9 no oviduto de vacas superestimuladas.

269

270 Agradecimentos

271 Os autores agradecem ao Laboratório Multi-user de Fitomedicamentos,
272 Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do
273 Estado de São Paulo (FAPESP; número: 2016/22812-5).

274

275 Referências

276 1. Binelli M, Gonella-Diaza AM, Mesquita FS, Membrive CMB. Sex Steroid-Mediated
277 Control of Oviductal Function in Cattle. *Biology (Basel)* [Internet]. 2018 Feb 2 [cited
278 2022 Jan 3];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29393864/>

279 2. Steinhauer N, Boos A, Günzel-Apel AR. Morphological changes and proliferative
280 activity in the oviductal epithelium during hormonally defined stages of the oestrous
281 cycle in the bitch. *Reprod Domest Anim.* 2004 Apr;39(2):110–9.

282 3. Barros CM, Nogueira MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology.*
283 2001 Dec 1;56(9):1483–96.

284 4. Cognie Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* [Internet].
285 1999 Jan 1 [cited 2022 Dec 16];51(1):105–16. Available from:
286 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10729066/>

287 5. Barros C, Nogueira M. Embryo Transfer Newsletter SUPEROVULATION IN ZEBU
288 CATTLE: PROTOCOL P-361e. *Embryo Transf Newsl.* 2005;23(5):390.

289 6. Fontes PK, Razza EM, Pupulim AGR, Barros CM, de Souza Castilho AC.
290 Equine chorionic gonadotropin increases estradiol levels in the bovine oviduct and
291 drives the transcription of genes related to fertilization in superstimulated cows. *Mol*
292 *Reprod Dev* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Dec 28];86(11):1582–91. Available
293 from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31353672/>

294 7. Jun J, Kim C, Perez-Villabona C, Gerton G. Differential expression of mucins in

- 295 mouse oviduct and uterus. *Fertil Steril* [Internet]. 2001 Sep 1 [cited 2021 Dec
296 30];76(3):S35. Available from:
297 <http://www.fertstert.org/article/S0015028201021227/fulltext>
- 298 8. Seo JT, Lee JS, Jun JH, Yang MH. Expression of Mucin Genes in the Human Testis
299 and Its Relationship to Spermatogenesis. *Yonsei Med J* [Internet]. 2005 [cited 2021 Dec
300 30];46(5):667. Available from: [/pmc/articles/PMC2810573/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10542193/)
- 301 9. Ferez-Vilar J, Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem*
302 [Internet]. 1999 Nov 5 [cited 2021 Dec 30];274(45):31751–4. Available from:
303 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10542193/>
- 304 10. Buhi WC. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-
305 dependent glycoprotein. *Reproduction* [Internet]. 2002 [cited 2021 Dec 28];123(3):355–
306 62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11882012/>
- 307 11. Fontes PK, Castilho ACS, Razza EM, Ereno RL, Satrapa RA, Barros CM.
308 Prostaglandin receptors (EP2 and EP4) and angiotensin receptor (AGTR2) mRNA
309 expression increases in the oviducts of Nelore cows submitted to ovarian
310 superstimulation. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2014 [cited 2021 Dec 28];151(3–4):112–
311 8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25459076/>
- 312 12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-
313 Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001 Dec 1;25(4):402–8.
- 314 13. Lamy J, Labas V, Harichaux G, Tsikis G, Mermillod P, Saint-Dizier M. Regulation
315 of the bovine oviductal fluid proteome. *Reproduction* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022
316 Dec 19];152(6):629–44. Available from:
317 <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/152/6/629.xml>
- 318 14. Pillai VV, Weber DM, Phinney BS, Selvaraj V. Profiling of proteins secreted in the
319 bovine oviduct reveals diverse functions of this luminal microenvironment. Kues WA,

- 320 editor. PLoS One [Internet]. 2017 Nov 20;12(11):e0188105. Available from:
321 <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0188105>
- 322 15. Leese HJ. The formation and function of oviduct fluid. J Reprod Fertil [Internet].
323 1988 [cited 2022 Dec 19];82(2):843–56. Available from:
324 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3283349/>
- 325 16. Talbot P, Geiske C, Knoll M. Oocyte pickup by the mammalian oviduct. Mol
326 Biol Cell [Internet]. 1999 Oct 13 [cited 2022 Jan 5];10(1):5–8. Available from:
327 <https://www.molbiolcell.org/doi/abs/10.1091/mbc.10.1.5>
- 328 17. Santos PH, Satrapa RA, Fontes PK, Franchi FF, Razza EM, Mani F, et al. Effect
329 of superstimulation on the expression of microRNAs and genes involved in
330 steroidogenesis and ovulation in Nelore cows. Theriogenology [Internet]. 2018 Apr 1
331 [cited 2022 Dec 16];110:192–200. Available from:
332 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29407901/>
- 333 18. Bauersachs S, Blum H, Mallok S, Wenigerkind H, Rief S, Prella K, et al. Regulation
334 of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the
335 postovulation period: a transcriptomics approach. Biol Reprod [Internet]. 2003 Apr 1
336 [cited 2022 Dec 19];68(4):1170–7. Available from:
337 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12606461/>
- 338 19. Cerny KL, Garrett E, Walton AJ, Anderson LH, Bridges PJ. A transcriptomal
339 analysis of bovine oviductal epithelial cells collected during the follicular phase versus
340 the luteal phase of the estrous cycle. Reprod Biol Endocrinol [Internet]. 2015 Dec
341 5;13(1):84. Available from: [https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-](https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-015-0077-1)
342 [015-0077-1](https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-015-0077-1)
- 343 20. Gonella-Diaza AM, da Silva Andrade SC, Sponchiado M, Pugliesi G, Mesquita FS,
344 Van Hoeck V, et al. Oviductal transcriptional profiling of a bovine fertility model by

- 345 next-generation sequencing. *Genomics Data*. 2017 Sep 1;13:27–9.
- 346 21. Ghersevich S, Massa E, Zumoffen C. Oviductal secretion and gamete interaction.
347 *Reproduction* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Dec 19];149(1):R1–14. Available from:
348 <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/149/1/R1.xml>
- 349 22. Killian G. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Evidence
350 that oviduct secretions influence sperm function: A retrospective view for livestock. *J*
351 *Anim Sci* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2022 Dec 19];89(5):1315–22. Available from:
352 <https://academic.oup.com/jas/article/89/5/1315/4764414>
- 353 23. Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ. Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues*
354 *Organs*. 2000;166(2):165–79.
- 355 24. Carrasco LC, Romar R, Avilés M, Gadea J, Coy P. Determination of glycosidase
356 activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle.
357 *Reproduction* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2022 Dec 19];136(6):833–42. Available
358 from: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/136/6/833.xml>
- 359 25. Boilard M, Reyes-Moreno C, Lachance C, Massicotte L, Bailey JL, Sirard MA,
360 et al. Localization of the Chaperone Proteins GRP78 and HSP60 on the Luminal
361 Surface of Bovine Oviduct Epithelial Cells and Their Association with Spermatozoa.
362 *Biol Reprod* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2022 Dec 19];71(6):1879–89. Available from:
363 <https://academic.oup.com/biolreprod/article/71/6/1879/3028792>
- 364 26. Coy P, Cánovas S, Mondéjar I, Saavedra MD, Romar R, Grullón L, et al.
365 Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction
366 during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Natl Acad Sci U S*
367 *A* [Internet]. 2008 Oct 14 [cited 2022 Dec 19];105(41):15809–14. Available from:
368 <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0804422105>
- 369 27. Phopin K, Nimlamool W, Bartlett MJ, Bean BS. Distribution, crypticity,

370 stability, and localization of α -L-fucosidase of mouse cauda epididymal sperm. *Mol*
371 *Reprod Dev* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2022 Dec 19];79(3):208–17. Available from:
372 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrd.22016>

373 28. Mondéjar I, Martínez-Martínez I, Avilés M, Coy P. Identification of potential
374 oviductal factors responsible for zona pellucida hardening and monospermy during
375 fertilization in mammals. *Biol Reprod* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2022 Dec
376 19];89(3):67–8. Available from: [https://academic.oup.com/biolreprod/article/89/3/67, 1-](https://academic.oup.com/biolreprod/article/89/3/67/1-8/2514188)
377 [8/2514188](https://academic.oup.com/biolreprod/article/89/3/67/1-8/2514188)

378 29. Marín-Briggiler CI, González-Echeverría MF, Munuce MJ, Ghersevich S, Caille
379 AM, Hellman U, et al. Glucose-regulated protein 78 (Grp78/BiP) is secreted by human
380 oviduct epithelial cells and the recombinant protein modulates sperm-zona pellucida
381 binding. *Fertil Steril* [Internet]. 2010 Mar 15 [cited 2022 Dec 19];93(5):1574–84.
382 Available from: <http://www.fertstert.org/article/S001502820804822X/fulltext>

383 30. Romero-Aguirregomezcorta J, Matás C, Coy P. α -L-fucosidase enhances
384 capacitation-associated events in porcine spermatozoa. *Vet J*. 2015 Jan 1;203(1):109–14

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395 ANEXO A- NORMAS DA REVISTA ANIMAL REPRODUCTION

396 Sobre a revista

397 **Animal Reproduction** (ISSNs on-line 1984-3143 e impresso 1806-9614) é um periódico revisado
398 por pares publicado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. A revista é publicada
399 trimestralmente, apresentando artigos em inglês com pesquisas sobre os aspectos básicos, aplicados e
400 biotecnológicos da biologia reprodutiva de animais.

401 O nome abreviado da revista é **Anim. Reprod.** e deverá ser utilizado para citações em periódicos que
402 exigem esse padrão em suas referências.

403 Missão e escopo

404 A Animal Reproduction (AR) publica artigos científicos originais e revisões de literatura convidadas,
405 na forma de artigos de Pesquisa Básica, de Biotecnologia, de Pesquisa Aplicada e de Artigos de
406 Revisão, com o objetivo de contribuir para uma melhor compreensão dos fenômenos relacionados à
407 reprodução animal.

408 O escopo da revista se aplica a veterinários, biólogos e pesquisadores do campo da ciência animal,
409 sendo também de interesse para os profissionais da medicina humana. Animal Reproduction Journal é
410 o órgão oficial do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal no Brasil.

411 Contato

412 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA
413 Av. Cel José Dias Bicalho 1224, Loja 04 - Bairro São José
414 31275-050 Belo Horizonte, MG, Brasil.

415 +55(31)3491-7122
416 animreprod@cbra.org.br

417 Fontes de indexação

- Biological Abstracts
- Biosis Previews
- CABI Abstracts
- CAPES/Qualis A4
- Current Contents: Agric Biol Environ Sci
- Directory of Open Access Journals (DOAJ)
- JCR/ISI (2018, 0.991)
- MEDLINE/PubMed
- Scopus
- Web of Science

418

419 Propriedade intelectual

Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob
uma [Licença Creative Commons](#) do tipo atribuição BY

420 Editores-chefes

- **Carlos Eduardo Ambrósio** (Universidade de São Paulo,
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA,
Pirassununga, SP, Brasil)

- **Felipe Perecin** (Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da FZEA, Pirassununga, SP, Brasil)
- **Ivan Cunha Bustamante Filho** (Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, Lajeado, RS, Brasil)

421

422 **Editores associados**

- **Angela Maria Gonella Diaza** (University of Florida, Marianna, FL, USA)
- **Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan** (Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense - UFF, Niterói, RJ, Brasil)
- **Zamira Gibb** (The University of Newcastle, Callaghan, NSW, Australia)

423 **Escopo e política****Políticas editoriais****Políticas gerais**

Os manuscritos enviados devem ser originais e não devem estar sob consideração simultânea por qualquer outra publicação, nem ter sido previamente publicados em nenhuma forma ou meio. Além disso, se o artigo já tiver sido submetido a uma avaliação anterior, a carta de decisão correspondente deve ser anexada durante a submissão e esse fato deve ser mencionado na Carta de Apresentação. Todos os autores são inteiramente responsáveis por todos os dados, conceitos e informações contidos no artigo.

Taxa de processamento de artigo

A Animal Reproduction cobra uma taxa fixa após a aceitação do artigo. Existem três valores diferentes para a Taxa de Processamento de Artigo (Article Processing Charge - APC):

- R\$ 1600,00 para os não membros da CBRA
- R\$ 800,00 para membros da CBRA
- US\$ 450,00 para autores não brasileiros

424

425 **Dispensa de taxa e descontos**

426

427

428

429

430

431

Autores de países de baixa renda e sem acesso a financiamento para cobrir a Taxa de Processamento de Artigo podem solicitar uma liberação ou desconto na taxa após o recebimento do aceite para publicação do manuscrito. As solicitações devem ser realizadas através da página de contato do periódico e devem incluir as informações do manuscrito aceito e as razões do autor para solicitar a liberação ou desconto da taxa.

432 **Políticas de acesso aberto, direitos autorais e **autoarquivamento****

433

434

435

436

437

438

Todo o conteúdo da revista e os artigos publicados pela revista Animal Reproduction, exceto onde especificado de outra forma, estão licenciados sob a licença Creative Commons Attribution. Autores de artigos publicados pela Animal Reproduction mantêm os direitos autorais de seus trabalhos, licenciando-os sob a licença Creative Commons Attribution, que permite que os artigos sejam reutilizados e distribuídos sem restrição, desde que o trabalho original seja corretamente citado.

439 A Animal Reproduction encoraja os Autores a **autoarquivar** seus manuscritos aceitos, publicando-os
 440 em blogs pessoais, repositórios institucionais e mídias sociais acadêmicas, bem como postando-os em
 441 suas mídias sociais pessoais, desde que seja incluída a citação completa à versão do website da
 442 revista.

443 **Linguagem**

444 Todos os manuscritos devem ser escritos em inglês americano padrão. Recomendamos o Dicionário
 445 Merriam-Webster's para verificação ortográfica e as Diretrizes EASE para Autores e Tradutores de
 446 Artigos Científicos a serem publicados em inglês (<http://www.ease.org.uk/publications/> / autor-
 447 guidelines). Os autores cuja língua nativa não é o inglês são fortemente aconselhados a ter seus
 448 manuscritos verificados por um revisor familiarizado com a linguagem científica e vocabulário, ou
 449 por uma empresa especializada, apresentando um certificado de revisão de inglês. Manuscritos não
 450 escritos em inglês padrão aceitável serão devolvidos ao autor antes de serem enviados aos revisores
 451 científicos.

452 **Processo de Revisão por Pares**

453 A revista Animal Reproduction tem um processo de revisão em 3 etapas:
 454

- 455 • Todos os manuscritos submetidos passam por uma verificação técnica para checar se as políticas
 456 editoriais da Animal Reproduction e as diretrizes de preparação do manuscrito foram seguidas.
 457 As submissões que não passarem nessa checagem serão devolvidas ao autor para correção dos
 458 problemas.
- 459 • Os manuscritos são então enviados para os editores-chefes que realizam uma pré-avaliação de
 460 originalidade, escopo e adequação do periódico. Os manuscritos recusados não serão enviados
 461 para revisão por pares e serão devolvidos aos autores com as razões para tal decisão editorial. Os
 462 Editores buscam realizar essa primeira etapa de triagem e enviar sua decisão em 70 dias.
- 463 • Os manuscritos aceitos nesta primeira triagem serão enviados para avaliação por pares por, pelo
 464 menos, dois revisores para uma revisão cega. Depois que os revisores ad hoc concluírem sua
 465 avaliação, o Editor devolverá o manuscrito aos autores com uma aceitação, rejeição ou pedido de
 466 revisão, de acordo com as sugestões dos revisores. Manuscritos revisados enviados pelos autores
 467 serão enviados ao Editor-chefe para sua decisão final e os revisores podem ser solicitados para
 468 fazer avaliações adicionais.

469 **Políticas da Seção**

471 A Animal Reproduction não impõe limites para contagem de palavras ou de referências para artigos
 472 originais e de revisão, mas os editores e revisores podem fazer recomendações com relação à clareza e
 473 qualidade do texto e excesso, falta ou relevância de referências.
 474

475 ***Artigos Originais***

476 Artigos que relatam pesquisas originais e/ou dados relacionados às áreas de pesquisa de interesse para
 477 a Animal Reproduction.
 478 Os artigos originais podem ser submetidos livremente e não devem ter sido publicados anteriormente
 479 em outro lugar.
 480

481 ***Artigos de Revisão***

482 Artigos de revisão de interesse para o campo da reprodução animal serão submetidos por convite
 483 direto do corpo editorial, mas os autores também podem enviar manuscritos de revisão livremente.
 484

485 ***Comunicações Breves***

- 486
487 Comunicações breves devem relatar ou estar relacionados a novas técnicas envolvidas na biologia da
488 reprodução.
489 Abertos para submissões pelos autores e devem ter no máximo 2000 palavras, incluindo a lista de
490 referências e apenas 2 figuras e 2 tabelas.
- 491 ***Anais de Conferência***
- 492
493 A revista Animal Reproduction publica artigos originais completos, resumos e workshops quando
494 apresentados em conferências das Academic Animal Reproduction Societies apoiadas pelo jornal.
- 495 ***Artigos de Conferência***
- 496
497 Estes devem ser Artigos Originais apresentados nas conferências apoiadas pela Animal Reproduction.
498 Os artigos devem ser elaborados seguindo as mesmas regras e políticas editoriais da revista Animal
499 Reproduction e passam pelo mesmo processo de avaliação. A SciELO não indexa em tipo de artigo.
- 500 **Autoria e declarações**
- 501 ***Autoria***
- 502
503 Os autores devem entrar em acordo acerca da autoria do manuscrito, certificando-se de que a lista
504 ilustra com precisão os colaboradores que realmente contribuíram de forma significativa para o
505 trabalho. Todos aqueles listados como autores devem se qualificar por contribuições substanciais
506 sobre a concepção e desenho da pesquisa, aquisição de dados, interpretação e avaliação e devem ter
507 participado ativamente durante a revisão e aprovação da versão final do manuscrito, com substancial
508 envolvimento intelectual, em especial na discussão dos resultados.
- 509 ***Contribuição e responsabilidade dos autores***
- 510
511 Todos os autores devem aprovar a versão final do manuscrito, aceitando a responsabilidade por cada
512 parte do trabalho colaborativo realizado na versão final do manuscrito. Adicionalmente a contribuição
513 específica de cada autor segundo as designações padrão do **CRediT**, deverão ser incluídas na Cover
514 Letter, conforme descrito nas diretrizes para preparação de manuscritos.
- 515 ***Mudanças na Autoria após a Submissão***
- 516
517 Quaisquer alterações na autoria durante o processo de revisão do manuscrito só serão consideradas
518 pelos editores se importantes experimentos adicionais ou contribuições relevantes tiverem sido feitos
519 e justificados. Tais alterações na autoria devem ser solicitadas na carta de submissão da versão
520 revisada, que precisa ser descrita em detalhes, explicando a justificativa para a mudança.
- 521 ***Agradecimentos***
- 522
523 As contribuições de qualquer pessoa que não atenda aos critérios de autoria devem ser listadas, com
524 permissão do colaborador, na seção de Agradecimentos (por exemplo, para reconhecer contribuições
525 de pessoas que forneceram ajuda técnica, colaboração de dados, assistência com redação ou revisão,
526 aquisição de financiamento, ou um assessor de departamento que forneceu apoio geral).
- 527 ***Conflito de Interesse***
- 528
529 Os autores devem incluir uma declaração revelando quaisquer potenciais conflitos de interesses. A
530 Animal Reproduction considera potenciais conflitos de interesses eventos de natureza pessoal,
531 comercial, política ou acadêmica, envolvendo ou não compensações financeiras.

532 ***Declaração de financiamento***

533

534 Todo o apoio financeiro recebido deve ser divulgado por todos os autores. Use as iniciais do autor
535 seguidas por uma breve descrição e também inclua o nome da agência de financiamento e o(s)
536 número(s) de identificação do projeto, nessa ordem.

537 ***Ética em pesquisa e más práticas***

538

539 Autores, editores e revisores devem seguir o mais alto nível de ética em toda a pesquisa, aquisição e
540 processamento de dados, até a redação, avaliação e publicação do manuscrito.
541 Durante as etapas de avaliação autores, revisores e editores devem comunicar o Editor-chefe sempre
542 que observarem a existência de um potencial conflito de interesses que possa influenciar na
543 elaboração ou avaliação de manuscritos. A Animal Reproduction considera potenciais conflitos de
544 interesses eventos de natureza pessoal, comercial, política ou acadêmica, envolvendo ou não
545 compensações financeiras.

546 Os Editores da Animal Reproduction tomarão medidas ativas se qualquer suspeita ética ou de má
547 conduta for identificada durante a avaliação ou após a publicação dos manuscritos. Sempre que
548 necessário, as questões serão investigadas de acordo com os fluxogramas disponíveis do Comitê de
549 Ética da Publicação (COPE).

550 A partir de 2019, a Animal Reproduction examinará ativamente os manuscritos submetidos usando o
551 sistema de verificação de similaridade "Similarity check", fornecido pela CrossRef.

552 **Direitos de seres humanos e animais**

553

554 Os autores devem incluir uma declaração detalhando o cumprimento das diretrizes e/ou aprovação por
555 comitê de ética na seção de materiais e métodos do manuscrito. Os editores podem solicitar aos
556 autores que enviem uma cópia da carta oficial de aprovação do comitê de ética. Os autores são
557 encorajados a conhecer e seguir as diretrizes da "Animal Research: Reporting In Vivo Experiments
558 (ARRIVE)" para relatar estudos em animais. Os ensaios clínicos não são o foco do periódico, no
559 entanto ensaios pré-clínicos e uso de animais nos experimentos serão avaliados criticamente para
560 evitar o sofrimento dos animais e garantir que os direitos dos animais estão sendo respeitados. Em
561 pesquisas envolvendo animais de estimação ou sempre que necessário, os autores devem coletar e
562 arquivar um formulário de consentimento informado assinado pelo dono do animal.

563 **Diretrizes para pesquisas**

564

565 Os autores são encorajados a seguir boas práticas ao elaborar e escrever seu trabalho. A Animal
566 Reproduction recomenda que os autores busquem orientações adequadas sobre o tipo de estudo que
567 estão relatando e sugere os seguintes recursos, conforme recomendado pelo ICMJE - Comitê
568 Internacional de Editores de Revistas Médicas:

- ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) para relatar estudos em animais,
- PRISMA para revisões sistemáticas e meta-análises,
- STARD para estudos de precisão em diagnósticos, e
- EQUATOR Network e NLM's Reporting Reporting Guidelines and Initiatives para outras diretrizes.

Além disso, os manuscritos de revisão devem descrever os métodos usados para localizar, selecionar, extrair e sintetizar os dados.

Políticas de compartilhamento de dados

A Animal Reproduction está desenvolvendo suas políticas de compartilhamento de

dados com as Diretrizes TOP (Transparency and Openness Promotion) em mente.

A partir de julho de 2019, a Reprodução Animal está encorajando os autores a depositar seus dados de pesquisa no repositório de dados relevante e incluir uma citação e um link para o conjunto de dados nos artigos submetidos. Se isso não for possível, os autores devem fazer uma declaração na Cover Letter explicando por que os dados da pesquisa não podem ser compartilhados.

569

570 **Forma e preparação de manuscritos**

Diretrizes para preparação de manuscritos

Unidades de medida

Unidades de medida devem ser usadas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades.

571 **Abreviaturas e Símbolos**

572

573 Abreviaturas, siglas e símbolos devem ser evitados, a menos quando amplamente adotados na área.
574 Ao usar siglas ou abreviaturas, seu significado deve ser descrito na primeira ocorrência no texto.

575 **Cover Letter**

576

577 Nome do arquivo: coverletter.doc

578

579 A carta de apresentação deve ser carregada no sistema de submissão na etapa apropriada e deve
580 incluir os seguintes elementos:

581 **Preparação do Manuscrito**

582

583 Uma breve apresentação descrevendo a pesquisa, destacando os motivos pelos quais os autores
584 acreditam que o trabalho é adequado para publicação na Animal Reproduction. Esta apresentação
585 também deve mencionar se o manuscrito já foi anteriormente avaliado por outros periódicos e, em
586 caso afirmativo, as cartas de decisão final e os relatórios devem ser carregados no sistema de
587 submissão sob a designação “Supplemental file NOT for Review”.

588 **Declaração de Conflito de Interesse**

589

590 Os autores devem incluir uma declaração revelando qualquer potencial conflito de interesses referente
591 a todos os autores. No caso de não haver conflitos que merecem ser mencionados por nenhum dos
592 autores, a seguinte declaração deve ser incluída: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

593 **Exemplo:**

594 **Declaração de conflito de interesse:**

595

596 A HSA declara ter recebido uma compensação financeira por ministrar treinamento na empresa
597 fornecedora dos equipamentos utilizados nesta pesquisa (ACME Corporation) anteriormente à
598 realização da pesquisa relacionada a este trabalho, e deseja informar que isso não interferiu de forma
599 alguma no estudo.

600
601 Os demais autores não tinham conflito de interesses a divulgar.

602 **Declaração de Financiamento**

603
604 Use as iniciais do autor seguidas por uma breve descrição como descrito nas nossas políticas e
605 certifique-se de incluir o nome da agência de financiamento e o(s) número(s) de processo, nessa
606 ordem.

607 **Exemplo:**

608 **Declaração de financiamento**

609
610 A HSA recebeu financiamento para esta pesquisa desta Agência de Financiamento (número do
611 subsídio # 555-2018 e # 123-2018) e desta outra Agência (número do subsídio # 312556-15).

612 **Contribuições dos Autores**

613
614 A contribuição de cada autor deve ser descrita usando as iniciais do Autor seguidas das designações
615 padrão do CRediT.

616 **Exemplo:**

617 **Contribuições do autor**

618
619 LGP: Conceituação, Aquisição de financiamento, Supervisão, Redação - rascunho original, Redação -
620 revisão e edição; RAP: Conceptualização, Curadoria de dados, Análise formal, Metodologia, Redação
621 - rascunho original, Redação - revisão e edição; AVP: Curadoria de dados, Análise formal;

622 **Declaração de depósito e disponibilização de dados**

623
624 A declaração dos autores acerca do depósito e disponibilização dos dados brutos deve indicar se os
625 dados estão disponíveis e onde ou como podem ser obtidos. Caso os dados não possam ser
626 disponibilizados, os autores devem indicar esse fato e o motivo.

627 **Formulário de concordância e copyright**

628
629 Nome do arquivo: agreement.doc

630
631 Como declarado em nossas políticas, os direitos autorais permanecem com os autores. No entanto, o
632 autor correspondente deve fazer o upload do documento "Authorship Responsibility, Copyright and
633 Publishing Licence Agreement" assinado em nome de todos os autores.
634 Este arquivo deve ser carregado no sistema de submissão sob a designação "Copyright Agreement
635 Form".

636 **Documento principal**

637
638 Nome do arquivo: manuscript.doc

639
640 O arquivo do documento principal para o manuscrito deve ser formatado usando o Microsoft Word ©
641 2010 ou superior. As páginas devem ser definidas no tamanho A4 (21,0 x 29,7) com margens de 3 cm
642 usando a fonte Times New Roman tamanho 12, sem utilizar formatação desnecessária, usando espaço

643 duplo, com linhas numeradas e páginas numeradas. Títulos de seções e subseções devem ser
644 formatados usando os estilos de títulos padrão do Word.
645 O documento principal precisa ser estruturado conforme descrito nas seguintes seções:

646 **1. Folha de rosto**

647 A página inicial do manuscrito deve ter as seguintes informações. Os itens indicados com o símbolo
648 de asterisco (*) apenas devem ser incluídos para trabalhos submetidos a conferências apoiadas pela
649 Animal Reproduction.

650 **Título da conferência**

651
652 O título completo incluído local e data, conforme exemplo abaixo:

653 Proceedings of the 35th Annual Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE);
654 Murcia, Spain, September 12th and 14th, 2019.

655 **Tipo de documento**

656
657 Indicar o tipo de trabalho, sendo: Conference paper, Conference Abstract, Conference Workshop
658 Abstract.

659 **Tipo de artigo**

660
661 Indique o tipo de artigo conforme selecionado no sistema de submissão: Basic Research Article,
662 Biotechnology Article, Applied Research Article or Review Article.

663 **Título para cabeçalho**

664
665 Não deve ter mais que 50 caracteres, incluindo os espaços.

666 **Título do manuscrito**

667
668 O título deve ser sucinto, mas descrever o foco do estudo e os principais resultados.
669 As palavras do título devem estar em negrito, com apenas a primeira letra da primeira palavra em
670 maiúscula.

671 **Autoria**

672 Os nomes completos dos autores devem ser listados abaixo do título, sem abreviações. Após cada
673 nome, use algarismos arábicos sobrescritos para indicar suas afiliações e inclua o ORCID de todos os
674 autores entre parênteses. Um símbolo de asterisco (*) deve ser usado para indicar o autor
675 correspondente.

676 **Exemplo:**

677 Rex Rex A. Hess^{1,2} (<https://orcid.org/0000-0003-2345-6789>), Kay Carnes² (<https://orcid.org/0000-0002-2345-6789>), Luiz Renato França^{3*} (<https://orcid.org/0000-0001-2345-6789>)

679 Autores que não possuam ORCID devem cadastrar-se em <https://orcid.org>.

680 **Afiliações**

681 As afiliações dos autores devem ser listadas abaixo da lista de autores usando os mesmos algarismos
682 arábicos sobrescritos para identificá-las. A lista de afiliações deve incluir apenas instituições onde
683 cada autor realmente desenvolveu trabalho e pesquisa relacionada ao artigo.
684 Os nomes das instituições devem ser escritos no idioma original da instituição ou em inglês quando
685 não estiverem em alfabeto romano.

686 **Exemplo:**

687 1 Full Institution Name, Department, City, State, Country
 688 2 Nome da Instituição no seu Idioma de Origem, Department, City, State, Country
 689 3 Full Institution Name, Department, City, State, Country

690 **Endereço para correspondência**

691
 692 Nome do autor para correspondência, e-mail e endereço postal devem ser listados após as afiliações e
 693 identificados com o símbolo de asterisco (*).

694 **Exemplo:**

695 * Correspondence: Full Author Name, corresponding@author.email.com, full postal address.

696 **2. Resumo**

697
 698 O objetivo do trabalho deve ser claro e resumidamente declarado, incluir os métodos e resumir as
 699 conclusões. Limite de palavras: 300 palavras.

700 **3. Palavras-chave**

701
 702 As palavras-chave devem ser listadas após o resumo. No máximo 5 palavras-chave devem ser
 703 incluídas.

704 **4. Introdução**

705
 706 Esta seção deve fornecer informações básicas que levem à hipótese testada. A seção deve terminar
 707 com uma breve descrição dos objetivos do trabalho.

708 **5. Métodos**

709
 710 Deve incluir o desenho do estudo, o tipo de materiais envolvidos, o número de animais por grupo,
 711 uma descrição clara de todos os métodos utilizados e/ou referências claras a métodos previamente
 712 publicados e o tipo de análise utilizada.
 713 Informações sobre registro e aprovação por comitê de ética e pesquisa devem ser inseridas ao final
 714 desta seção.

715 **6. Resultados**

716
 717 Os principais resultados encontrados devem ser descritos de forma clara e objetiva. A seção de
 718 resultados pode ser dividida em subseções com cabeçalhos curtos e informativos.

719 **7. Discussão**

720
 721 Esta seção pode ser dividida em subseções com cabeçalhos curtos e informativos. A discussão deve
 722 ser focada nos resultados encontrados.

723 **8. Conclusão**

724
 725 As principais conclusões apoiadas pelos dados da pesquisa devem ser apresentadas de forma clara e
 726 objetiva.

727 **9. Agradecimentos**

728
729 Os colaboradores que não atendem aos critérios de autoria, conforme descrito em nossas políticas
730 editoriais, devem ser mencionados nesta seção desde que tenham concedido sua autorização.

731 **10. Referências bibliográficas**

732
733 A seção de referências deve começar em uma nova página, seguindo o estilo Vancouver, conforme
734 descrito abaixo. Todas as referências devem ser citadas e a exatidão de todas as informações é de
735 responsabilidade dos autores.

736 **11. Tabelas**

737
738 Um conjunto de dados alfanuméricos que é organizado em linhas e colunas. Todas as tabelas devem
739 ser enviadas no final do manuscrito, cada uma em uma nova página. Tabelas devem ser o mais
740 simples possível e linhas horizontais devem ser usadas somente na parte superior e inferior da tabela.
741 As células da tabela nunca devem ser divididas com linhas diagonais. O título deve preceder a tabela e
742 começar com a palavra "Table" seguida de seu número em algarismos arábicos. As tabelas devem ser
743 citadas no texto como Table 1, Table 2, etc., na ordem em que são usadas. Todas as abreviaturas ou
744 anotações devem ser explicadas em notas de rodapé; se necessário, utilize símbolos para incluir as
745 explicações (*, †, ‡, §, etc.).

746 **12. Figuras e legendas**

747
748 Quaisquer ilustrações, sejam fotografias, gráficos, esquemas, fluxogramas, etc., devem ser citadas
749 como figuras. Cada figura deve ser identificada e enviada em arquivo separado de alta resolução,
750 certificando-se de que o menor texto esteja perfeitamente legível. A lista de legendas deve começar
751 em uma nova página no final do manuscrito. As figuras devem ser citadas na ordem numérica em que
752 estão listadas: Fig. 1, Fig. 2, Figs. 1-2, etc.

753
754 Quando necessário, os autores são responsáveis por obter a autorização apropriada para usar imagens
755 e ilustrações de outras fontes, de acordo com o proprietário original dos direitos autorais, e incluir
756 uma citação adequada.

757 **Referências e estilo de citação**

758
759 A seção de referências deve seguir o estilo de Vancouver. Uma pequena amostra com exemplo de
760 referências bibliográficas comuns está incluída abaixo. Por favor, verifique uma lista com muito mais
761 exemplos e detalhes.

762
763 Todas as referências devem ser citadas e a exatidão de todas as informações é de responsabilidade dos
764 autores.

765 As referências devem ser listadas primeiro em ordem alfabética e, em seguida, por ano, utilizando
766 letras minúsculas para diferenciar as referências de mesmos autores e ano.
767 Use "no prelo" somente quando a aceitação formal for concedida.

768 **Citações de texto**

769
770 Todas as referências devem ser citadas usando o estilo Autor-Data como mostrado nos exemplos a
771 seguir:

- 772 • autor único: (Ginther, 1992) ou Ginther (1992).
- 773 • dois autores: (Varley e Foxcroft, 1990) ou Varley e Foxcroft (1990).
- 774 • mais de dois autores: (Quintero et al., 2000) ou Quintero et al. (2000).

- 775 • mais de um artigo citado: (Varley e Foxcroft, 1990; Ginther, 1992; Gastal et al., 1999a, b;
776 Quintero et al., 2000) ou Varley e Foxcroft (1990); Ginther (1992); Gastal et al. (1999a, b);
777 Quintero et al. (2000), sempre citados em ordem cronológica crescente.

778

779 **Lista de amostras de estilo de referência**780 **ARTIGOS EM PERIÓDICOS**

- 781 • Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle
782 and associated hormonal changes in mares. *Biol Reprod.* 1999a;61(3):724-30.
783 <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod61.3.724>. PMID:10456850.
- 784 • Gastal EL, Donadeu FX, Gastal MO, Ginther OJ. Echotextural changes in the follicular wall
785 during follicle deviation in mares. *Theriogenology.* 1999b;52(5):803-14.
786 [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00173-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00173-9). PMID:10735121.
- 787 • Hess RA, Carnes K. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and
788 species comparison. *Anim Reprod.* 2004;1:5-30.
- 789 • Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC.
790 Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated
791 with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod.* 2004;1:86-90.
- 792 • Varley MA, Foxcroft GR. Endocrinology of lactating and weaned sow. *J Reprod Fertil Suppl.*
793 1990;40:47-61. PMID:2192052.

794

795 **LIVROS, DISSERTAÇÕES E CONFERÊNCIAS**

- 796 • Basrur PK, Kochhar HS. Inherited sex abnormalities in goats. In: Youngquist RS, Threlfall WR,
797 editors. *Current therapy in large animal theriogenology.* Philadelphia: WB Saunders; 1997. p.
798 590-4.
- 799 • Ginther OJ. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects.* 2nd ed. Cross Plains:
800 Equiservices Publishing; 1992. p. 105-72.
- 801 • Leal MC. Análise morfológica e funcional do testículo e eficiência espermatogênica em *Saguüs*
802 *Callithrix penicillata* (Primates: Callitrichidae) [dissertation]. Belo Horizonte: Universidade
803 Federal de Minas Gerais; 2004. Portuguese.
- 804 • Quintero B, Porter M, Sharp D, Cleaver B, Diaz T. Effect of season on LH concentrations and
805 LH pulse dynamics in mares located in the tropics. In: *Abstracts of the 14th International*
806 *Congress on Animal Reproduction; 2000 Jul 2-6; Stockholm, Sweden.* Stockholm: ICAR; 2000.
807 p. 290.

808

809 **DOCUMENTOS ELETRÔNICOS**

810

811 **CD-ROM**

- 812 • Anderson SC, Poulsen KB. Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. 2nd version.
813 Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. 1 CD-ROM: color, 4 3/4 in.

814 **Artigo de periódico na Internet**

- 815 • Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role.
816 *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2019 Jul 25];102(6):[about 3 p.].

817

818 **Monografia na Internet**

- 819 • Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the
820 Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2019 Jul 25]. Available from:
821 <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

822

823 **Website**

- 824 • Cancer Pain [homepage on the Internet]. New York: American Cancer Society; 2019 [cited
825 2019 Jul 25]. Available from: [https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-](https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/pain.html)
826 [effects/physical-side-effects/pain.html](https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/pain.html).

827

828 **Parte de website**

- 829 • AMA [homepage on the Internet]. Chicago: American Medical Association; 1995-2019. What's
830 healthy dying? 6 steps on the path for doctors to know; 2019 Jul 22 [cited 2019 Jul 25]; [about 2
831 screens]. Available from: [https://www.ama-assn.org/delivering-care/ethics/what-s-healthy-](https://www.ama-assn.org/delivering-care/ethics/what-s-healthy-dying-6-steps-path-doctors-know)
832 [dying-6-steps-path-doctors-know](https://www.ama-assn.org/delivering-care/ethics/what-s-healthy-dying-6-steps-path-doctors-know).

833

834 **Base de dados aberta na Internet**

- 835 • Who's Certified [database on the Internet]. Alexandria (VA): American Board of Facial Plastic
836 and Reconstructive Surgery; 2019 [cited 2019 Jul 25]. Available from:
837 <https://www.abfprs.org/certified/disclaimer>.

Base de dados fechada na Internet

- Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly, Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine; 2001 [cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html.

Parte de Base de dados na Internet

- MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine; 2002. Meta-analysis; unique ID: D015201; [cited 2003 Jun 10]; [about 3 screens]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>.

Trabalhos não publicados

Deve ser mencionado apenas no texto, e não na lista de referências.

Comunicação verbal

- As referências relativas a dados não publicados e “comunicações pessoais” não devem ser citadas na lista de referências, mas devem ser mencionadas no texto. Após as informações, o autor deve escrever a expressão “informação verbal” ou “comunicação pessoal”.

838

839 **Envio de manuscritos**

Todos os manuscritos devem ser enviados através do sistema on-line.

840