



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

**AMANDA TALYS SAMPAIO**

**USO DE FLUIDO OVIDUTAL SINTÉTICO (SOF) COMO MEIO ÚNICO NA  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE) BOVINOS**

**AMANDA TALYS SAMPAIO**

**USO DE FLUIDO OVIDUTAL SINTÉTICO (SOF) COMO MEIO ÚNICO NA  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE) BOVINOS**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Caliê Castilho Silvestre

636.089  
S192u

Sampaio, Amanda Talys.

Uso de fluido ovidutal sintético (SOF) como meio único na produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos / Amanda Talys Sampaio. – Presidente Prudente, 2026.  
57 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2026.

Bibliografia.

Orientador: Caliê Castilho Silvestre.

1. Competência oocitária. 2. Complexo *cumulus*-oócito. 3. Expressão gênica. 4. Blastocisto. I. Título.

Catálogo na fonte: Michele Mogni – CRB 8-6204

## **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: "USO DE FLUIDO OVIDUTAL SINTÉTICO (SOF) COMO MEIO ÚNICO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE) BOVINOS"**

**AUTOR(A): AMANDA TALYS SAMPAIO**

**ORIENTADOR(A): Profa. Dra. CALIÊ CASTILHO SILVESTRE**

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE(A) em  
CIÊNCIA ANIMAL

Área de Concentração FISIOPATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

**CALIÊ CASTILHO SILVESTRE** (orientadora)

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

**RAQUEL ZANETI PUELKER**

PROGEST Biotecnologia Animal / Botucatu (SP)

**ANTHONY CESAR DE SOUZA CASTILHO**

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Data da realização: Presidente Prudente, 20 de Fevereiro de 2026.

## Central de Assinaturas Eletrônicas

### Sobre o documento

Assunto: Documento eletrônico  
Status do documento: Concluído  
Data de criação do documento: 23/02/2026 09:55  
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília  
Número de assinaturas: 3  
Solicitante: KEID RIBEIRO KRUGER (#6433700)

### Signatários do documento

#### CALIE CASTILHO SILVESTRE (PROFESSOR)

calie@unoeste.br  
Recebido em 23/02/2026 09:55  
Assinado em 23/02/2026 10:15  
Assinatura Interna UNOESTE  
Usando endereço IP: 177.131.32.97  
ID da assinatura: 6341482

#### RAQUEL ZANETI PUELKER (SIGNATÁRIO EXTERNO)

rapuelker@hotmail.com  
Recebido em 23/02/2026 09:55  
Assinado em 23/02/2026 10:01  
Assinatura Interna UNOESTE  
Usando endereço IP: 2804:18:1948:7597:4df4:960f:c820:f9a9  
ID da assinatura: 6341483

#### ANTHONY CESAR DE SOUZA CASTILHO (PROFESSOR)

castilho.anthony@gmail.com  
Recebido em 23/02/2026 09:55  
Assinado em 23/02/2026 10:48  
Assinatura Interna UNOESTE  
Usando endereço IP: 177.131.33.2  
ID da assinatura: 6341484

URL do documento: <https://www.unoeste.br/ca/e8211608>

Assinatura digital do documento: e451a0016e9964e6771034853c8809ba64389eef323dbafc9ca6d9e247edd75

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

Mantida pela EPEC - Empresa Prudentina de Educação e Cultura SA

Utilize o QRCode abaixo para conferir a autenticidade deste documento:



## **DEDICATÓRIA**

Primeiramente, dedico este trabalho a Deus, pela dádiva da vida, pelas oportunidades e pelas bênçãos recebidas, assim como pelas dificuldades que, transformadas em aprendizado, contribuíram para o meu crescimento pessoal e acadêmico.

Dedico aos meus pais, que, com amor incondicional, nunca mediram esforços para me proporcionar condições de estar aqui hoje e que sempre me apoiaram em cada etapa desta jornada.

Agradeço à minha família, que compreendeu meus desafios e esteve ao meu lado nos momentos de alegrias e dificuldades durante todo o trajeto para o título de Mestre, oferecendo suporte, compreensão e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Caliê Castilho, por sua orientação dedicada, paciência e pelo constante incentivo ao longo de toda esta jornada. Agradeço não apenas por sua competência como orientadora, mas também por sua amizade, por estar ao meu lado em cada etapa e por contribuir de maneira significativa para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório Biotera (Bruno Carrino, Caroline Schiavao, Rafael Tonzar) que sempre estiveram prontos para oferecer ajuda, apoio e colaboração em todos os momentos necessários, tornando a experiência no laboratório mais leve e enriquecedora.

Também sou grata aos alunos de iniciação científica (Bruno Henrique, Maria Eduarda e Natália Santos) que me auxiliaram nas atividades práticas do projeto. Foi um privilégio poder compartilhar conhecimentos com cada um deles, ensinando com dedicação e carinho, enquanto aprendíamos juntos durante essa experiência.

*“Lute com determinação, abrace a vida com paixão,  
perca com classe e vença com ousadia, porque o  
mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito  
bela para ser insignificante”. (Charlie Chaplin)*

## RESUMO

### Uso de fluido ovidutal sintético (SOF) como meio único na produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) consolidou-se como uma das principais biotécnicas reprodutivas, com o Brasil destacando-se como o maior produtor mundial de embriões. A PIVE compreende três etapas principais: maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), que tradicionalmente utilizam meios de cultivo distintos para atender às demandas metabólicas específicas dos gametas e do embrião em cada fase. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência do meio *Synthetic Oviduct Fluid* (SOF) como meio único nas etapas de MIV, FIV e CIV, por meio da análise da expansão das células do *cumulus*, maturação nuclear, conteúdo de gotículas lipídicas, taxas de clivagem e produção de blastocistos, bem como da expressão de genes relacionados ao metabolismo (*SCD1*, *SREBF1* e *SLC2A1*), estresse oxidativo (*GPX1*, *SOD1*, *SOD2* e *CPT1B*), apoptose (*CASP03*, *BCL2* e *BAX*) e implantação embrionária (*VEGF*). Folículos ovarianos provenientes de abatedouro local foram aspirados, e os complexos *cumulus* – oócito (CCOs), classificados entre os graus I e III, foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: grupo Controle, utilizando meios convencionais para MIV (TCM-199 suplementado com hormônios e 10% de soro fetal bovino) e FIV (TALP), e grupo SOF, no qual o meio SOF foi empregado nas etapas de MIV (SOF-MIV suplementado com hormônios e 10% de soro fetal bovino) e FIV (SOF-FIV). A expansão das células do *cumulus* foi avaliada antes e após a maturação. Após a MIV, parte dos oócitos foi destinada à análise do conteúdo lipídico por coloração com Sudan Black, à avaliação da maturação nuclear por coloração com Hoechst e à análise de intensidade mitocondrial pela fluorescência MitoTracker Red CMXROs, enquanto os demais foram submetidos à FIV e CIV para avaliação do desenvolvimento embrionário e análise da expressão de 11 genes-alvo em blastocistos produzidos. Oócitos maturados em meio SOF apresentaram maior taxa de maturação nuclear até a metáfase II ( $p = 0,01$ ), menor índice de degeneração ( $p = 0,05$ ) e menor intensidade mitocondrial ( $p < 0,0001$ ), embora o grupo Controle tenha apresentado maior expansão das células do *cumulus* ( $p = 0,001$ ). O uso do meio SOF não alterou o conteúdo lipídico dos oócitos ( $p = 0,39$ ), a taxa de clivagem

(71% vs. 68,5%;  $p = 0,74$ ), a produção de blastocistos (23,6% vs. 20%;  $p = 0,54$ ), nem o perfil de expressão gênica dos embriões ( $p > 0,05$ ). Conclui-se que o meio SOF, quando utilizado como meio único em todas as etapas da produção in vitro de embriões, constitui uma alternativa viável aos meios tradicionais, mantendo a competência oocitária, o desenvolvimento embrionário e os principais marcadores moleculares associados à produção embrionária.

**Palavras-chave:** Competência oocitária; complexo *cumulus*-oócito; expressão gênica; blastocisto.

## ABSTRACT

### **Use of synthetic oviductal fluid (SOF) as a single medium in the *in vitro* production (IVP) of bovine embryos obtained**

In vitro embryo production (IVEP) has become one of the main reproductive biotechnologies, with Brazil recognized as the world's largest producer of embryos. IVEP consists of three main stages: in vitro maturation (IVM), in vitro fertilization (IVF), and in vitro culture (IVC), which traditionally require different culture media to meet the specific metabolic demands of gametes and embryos at each stage. The aim of this study was to evaluate the efficiency of using Synthetic Oviduct Fluid (SOF) as a single medium for IVM, IVF, and IVC by analyzing *cumulus* cell expansion, nuclear maturation, lipid droplet content, cleavage and blastocyst production rates, and the expression of genes related to metabolism (*SCD1*, *SREBF1* and *SLC2A1*), oxidative stress (*GPX1*, *SOD1*, *SOD2* and *CPT1B*), apoptosis (*CASP03*, *BCL2* and *BAX*), and embryo implantation (*VEGF*). Ovarian follicles obtained from a local slaughterhouse were aspirated, and *cumulus*-oocyte complexes (CCOs), classified as grades I to III, were selected and randomly allocated into two experimental groups: a Control group, using conventional media for IVM (TCM-199 supplemented with hormones and 10% fetal bovine serum) and IVF (TALP), and an SOF group, in which SOF-based media were used for IVM (SOF-IVM supplemented with hormones and 10% fetal bovine serum) and IVF (SOF-IVF). *Cumulus* cell expansion was evaluated before and after maturation. After IVM, a subset of oocytes was subjected to Sudan Black staining for lipid content assessment and Hoechst staining for nuclear maturation analysis and mitochondrial intensity analysis by MitoTracker Red CMXROs fluorescence, while the remaining oocytes were used for IVF and IVC to assess embryo development and the expression of 11 target genes in the resulting blastocysts. Oocytes matured in SOF medium showed higher nuclear maturation rates to metaphase II ( $p = 0.01$ ), lower degeneration rates ( $p = 0.05$ ) and lower mitochondrial intensity ( $p < 0.0001$ ), although greater *cumulus* cell expansion was observed in the Control group ( $p = 0.001$ ). The use of SOF did not affect oocyte lipid content ( $p = 0.39$ ), cleavage rate (71% vs. 68.5%;  $p = 0.74$ ), blastocyst production (23.6% vs. 20%;  $p = 0.54$ ), or the molecular profile of embryos ( $p > 0.05$ ). In conclusion, SOF used as a single culture

medium throughout all stages of in vitro embryo production is a viable alternative to conventional media, maintaining oocyte competence, embryo development, and molecular markers associated with embryonic production.

**Keywords:** Oocyte competence; *cumulus*–oocyte complex; gene expression; blastocyst.

## LISTA DE SIGLAS

|                 |                                                              |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|
| mL              | – mililitro                                                  |
| mm              | – milímetro                                                  |
| µm              | – micrometro                                                 |
| µg              | – micrograma                                                 |
| µL              | – microlitro                                                 |
| °C              | – Graus Celsius                                              |
| <i>ACTB</i>     | – Beta-actina                                                |
| ATP             | – Adenosina trifosfato                                       |
| <i>BAX</i>      | – Proteína X associada a BCL2                                |
| <i>BCL2</i>     | – Regulador de apoptose BCL2                                 |
| BSA             | – Albumina sérica bovina                                     |
| <i>CASP03</i>   | – Caspase 03                                                 |
| CIV             | – Cultivo <i>in vitro</i>                                    |
| CO <sub>2</sub> | – Dióxido de carbono                                         |
| <i>CPT1B</i>    | – Carnitina palmitoiltransferase 1B                          |
| EROs            | – Espécies reativas a oxigênio                               |
| FIV             | – Fertilização <i>in vitro</i>                               |
| FSH             | – hormônio folículo estimulante                              |
| <i>GPX1</i>     | – Glutathione peroxidase 1                                   |
| LH              | – hormônio luteinizante                                      |
| MIV             | – Maturação <i>in vitro</i>                                  |
| PBS             | – Tampão salino fosfato                                      |
| PHE             | – Penicilamina, hipotaurina e epinefrina                     |
| PVA             | – Álcool polivinílico                                        |
| PIVE            | – Produção <i>in vitro</i> de embriões                       |
| <i>PPIA</i>     | – Peptidilprolil Isomerase A                                 |
| <i>SCD1</i>     | – Estearoil-CoA dessaturase                                  |
| SFB             | – Soro fetal bovino                                          |
| <i>SLC2A1</i>   | – Membro 1 da família 2 de transportadores de solutos        |
| <i>SOD1</i>     | – Superóxido dismutase 1, solúvel                            |
| <i>SOD2</i>     | – Superóxido dismutase 2, mitocondrial                       |
| SOF             | – Fluido ovidutal sintético                                  |
| SOF-FIV         | – Soro fetal bovino na etapa da fertilização <i>in vitro</i> |
| SOF-MIV         | – Soro fetal bovino na etapa da maturação <i>in vitro</i>    |

*SREBF1* – Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esteróis  
*TALP* – Albumina de Tyrode, lactato e piruvato  
*TCM 199* – Tissue Culture Medium 199  
*VEGF* – Fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Expansão das células do *cumulus* em oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* em meio controle (TCM-199) e em meio SOF-MIV. A) Quantificação da expansão das células do *cumulus* (média  $\pm$  EPM) analisada por meio do software ImageJ® em oócitos imaturos e após 24 horas de maturação *in vitro* nos grupos controle (imaturo, n = 342; maturo, n = 335) e SOF-MIV (imaturo, n = 327; maturo, n = 345). Asterisco (\*) indica diferença significativa entre os grupos (p = 0,0010). B) Oócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 horas (aumento de 50 $\times$ )..... 26
- Figura 2 – Avaliação do conteúdo lipídico em oócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 horas em meio controle e em meio SOF-MIV. A) Intensidade da escala de cinza (média  $\pm$  EPM) analisada por meio do software ImageJ® (controle, n = 148; SOF-MIV, n = 147; p = 0,87). B) Coloração por Sudan Black, na qual os pontos pretos representam gotículas lipídicas citoplasmáticas..... 27
- Figura 3 – A) Avaliação da intensidade mitocondrial (média  $\pm$  EPM) em oócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 horas em meio controle (n = 150) e em meio SOF-MIV (n = 154) analisados pelo software ImageJ®. B) Coloração por MitoTracker Red CMXROs, na qual a cor avermelhada representa a presença de mitocôndrias. Asterisco (\*) indica diferença significativa entre os grupos (p < 0,0001)..... 28
- Figura 4 – Desenvolvimento embrionário após fertilização *in vitro* em meio controle e em meio SOF. A) Taxa de clivagem (média  $\pm$  EPM) nos grupos controle (n = 328) e SOF (n = 325), avaliada 72 horas após a fertilização *in vitro*. B) Taxa de blastocistos (média  $\pm$  EPM) nos grupos controle (n = 328) e SOF (n = 325), avaliada sete dias após a fertilização *in vitro*..... 29
- Figura 5 – Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo lipídico, apoptose, estresse oxidativo e implantação embrionária em embriões cultivados por sete dias nos grupos controle (n = 25) e SOF (n = 25). A expressão gênica foi normalizada pela média geométrica dos genes de referência PPIA e ACTB, utilizando o método  $\Delta\Delta Ct$ ..... 30

## LISTA DE TABELAS

|            |                                                                                                                                                                                      |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – | Sigla do gene, nome da proteína, sequências dos primers direto (F) e reverso (R) e função dos genes quantificados por qPCR em blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> .....  | 25 |
| Tabela 2 – | Fases de maturação nuclear (média $\pm$ EPM) de oócitos bovinos maturados em meio controle (n = 150) e em meio SOF-MIV (n = 154), avaliadas por meio da coloração Hoechst 33342..... | 28 |

## SUMÁRIO

|            |                                                                     |           |
|------------|---------------------------------------------------------------------|-----------|
|            | <b>ARTIGO .....</b>                                                 | <b>17</b> |
|            | <b>RESUMO.....</b>                                                  | <b>18</b> |
| <b>1</b>   | <b>Introdução.....</b>                                              | <b>19</b> |
| <b>2</b>   | <b>Material e Métodos.....</b>                                      | <b>20</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Recuperação dos complexos <i>cumulus</i>-oócitos (CCOs).....</b> | <b>20</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....</b>                         | <b>21</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Expansão das células do <i>cumulus</i>.....</b>                  | <b>21</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Avaliação de gotículas lipídicas .....</b>                       | <b>22</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Maturação nuclear e intensidade mitocondrial.....</b>            | <b>22</b> |
| <b>2.6</b> | <b>Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....</b>                      | <b>23</b> |
| <b>2.7</b> | <b>Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....</b>                           | <b>24</b> |
| <b>2.8</b> | <b>Expressão Gênica.....</b>                                        | <b>24</b> |
| <b>2.9</b> | <b>Análise Estatística.....</b>                                     | <b>25</b> |
| <b>3</b>   | <b>Resultados.....</b>                                              | <b>26</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Expansão do complexo <i>cumulus</i> oócito (CCO).....</b>        | <b>26</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Avaliação de gotículas lipídicas.....</b>                        | <b>27</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Avaliação da maturação nuclear.....</b>                          | <b>27</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Avaliação da intensidade mitocondrial.....</b>                   | <b>28</b> |
| <b>3.5</b> | <b>Avaliação da taxa de clivagem e produção de embriões.....</b>    | <b>29</b> |
| <b>3.6</b> | <b>Expressão gênica.....</b>                                        | <b>29</b> |
| <b>4</b>   | <b>Discussão.....</b>                                               | <b>30</b> |
| <b>5</b>   | <b>Conclusão.....</b>                                               | <b>35</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                             | <b>37</b> |
|            | <b>ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....</b>          | <b>41</b> |
|            | <b>ANEXO B- NORMAS DA REVISTA.....</b>                              | <b>42</b> |

## IMPACTO POTENCIAL DESSA PESQUISA

A produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) é uma biotecnologia fundamental para o avanço genético e para o aumento da eficiência produtiva na bovinocultura. Entretanto, os protocolos convencionais utilizam diferentes meios de cultivo em cada uma das 3 etapas da PIVE, o que eleva custos, aumenta o tempo de manipulação e pode comprometer a padronização dos resultados. Diante disso, o estudo apresenta impacto científico, ao contribuir para a otimização dos protocolos de PIVE e ampliar o conhecimento sobre sistemas de cultivo simplificados. Do ponto de vista social, possibilita maior acesso à técnica, especialmente a pequenos produtores e laboratórios com menor estrutura. Em relação ao impacto tecnológico, promove a redução de etapas e maior padronização dos procedimentos, favorecendo automatização e diminuição de erros operacionais. Por fim, apresenta impacto inovador, ao propor uma abordagem alternativa ao modelo tradicional, por reduzir complexidade técnica, otimizar processos e ampliar a eficiência reprodutiva.

O presente estudo se encaixa em diferentes objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) da ONU, destacando-se:

- ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável): contribui para a melhoria da eficiência produtiva e para o avanço de sistemas pecuários sustentáveis.
- ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura): promove inovação ao propor um protocolo simplificado para a PIVE, favorecendo a modernização laboratorial.
- ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis): reduz o uso de insumos e resíduos laboratoriais devido à padronização do processo.
- ODS 15 (Vida Terrestre): favorece a conservação e o melhoramento genético por meio da multiplicação eficiente de animais de alto valor zootécnico.

*O artigo está apresentado nas normas do periódico Theriogenology, 97% Qualis A1.*

**Uso do meio SOF como meio único na produção in vitro de embriões bovinos mantém a competência oocitária e o desenvolvimento embrionário**

**Single-medium use of SOF during in vitro bovine embryo production maintains oocyte competence and embryo development**

Amanda Talys Sampaio<sup>a</sup>, Raquel Zaneti Puelker<sup>b</sup>, Bruno Henrique Couto Oliveira<sup>a</sup>, Rafael Martins Tonzar<sup>a</sup>, Natalia Vitor dos Santos<sup>a</sup>, Maria Eduarda Campos Ferreira<sup>a</sup>, Caroline Schiavão Fernandes<sup>a</sup>, Bruno Carrino Suave<sup>a</sup>, Anthony Cesar de Souza Castilho<sup>a</sup>, Ines Cristina Giometti<sup>a</sup>, Caliê Castilho<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil

<sup>b</sup>Progest Biotecnologia Animal, Botucatu, São Paulo, Brasil

\* Autor para correspondência: Rodovia Raposo Tavares, Km 572 - Bairro Limoeiro Presidente Prudente, SP- Brasil- CEP:19067-175. Tel.: +55 18 32292077; Fax: +55 18 3229-2080.

E-mail: calie@unoeste.br

## RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica reprodutiva amplamente empregada, com o Brasil destacando-se como o maior produtor mundial. Tradicionalmente, a PIVE utiliza diferentes meios de cultivo nas etapas de maturação (MIV), fertilização (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência do meio SOF como meio único nas etapas de MIV, FIV e CIV. Complexos *cumulus*–oócito (graus I a III), obtidos de ovários provenientes de abatedouro, foram distribuídos aleatoriamente entre grupo Controle, utilizando meios convencionais, e grupo SOF, no qual o meio base SOF foi suplementado de acordo com a necessidade específica para cada etapa. Foram avaliadas a expansão das células do *cumulus*, maturação nuclear, intensidade mitocondrial, conteúdo de gotículas lipídicas, taxas de clivagem e produção de blastocistos, além da expressão de genes relacionados ao metabolismo, estresse oxidativo, apoptose e implantação embrionária. Oócitos maturados em SOF apresentaram maior taxa de maturação nuclear até metáfase II ( $p = 0,01$ ), menor degeneração ( $p = 0,05$ ) e menor intensidade mitocondrial ( $p < 0,0001$ ), enquanto o grupo controle apresentou maior expansão das células do *cumulus* ( $p = 0,001$ ). O uso do meio SOF não alterou o conteúdo lipídico dos oócitos ( $p = 0,39$ ), as taxas de clivagem (71,0% vs 68,5%;  $p = 0,74$ ) e produção de blastocistos (23,6% vs 20,0%;  $p = 0,54$ ), nem o perfil de expressão gênica dos embriões ( $p > 0,05$ ). Conclui-se que o meio SOF, quando utilizado como meio único na PIVE, constitui uma alternativa viável aos meios tradicionais, mantendo a competência oocitária, o desenvolvimento embrionário e os marcadores moleculares associados à produção embrionária.

**Palavras-chave:** fluido ovidutal sintético; maturação oocitária; cultivo *in vitro*; desenvolvimento embrionário; expressão gênica.

## 1. Introdução

Apesar de sua ampla aplicação, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos ainda apresenta desafios relacionados à variabilidade nos resultados e à complexidade dos protocolos, que tradicionalmente utilizam meios distintos nas etapas de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) [1]. Essa segmentação exige grande controle técnico e logístico, o que pode aumentar os custos e introduzir fontes de variação entre laboratórios e dentro do laboratório.

O meio de cultivo exerce influência direta principalmente sobre a maturação oocitária, podendo afetar a qualidade ao interferir na expansão das células do *cumulus*, no metabolismo celular e, conseqüentemente, na competência do oócito [2]. Quando o meio SOF (fluido ovidutal sintético) suplementado com aminoácidos foi testado na maturação *in vitro*, observou-se produção de embriões semelhante ao obtido em oócitos maturados em TCM-199 [3]. Esse desempenho pode estar relacionado ao fato de que sua formulação é baseada na composição fisiológica do fluido ovidutal, ambiente no qual ocorrem naturalmente a maturação final do oócito, a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial [4]. Além disso, essa característica confere ao SOF versatilidade para receber suplementações específicas de acordo com as exigências de cada etapa da produção *in vitro* [5]

Estudos prévios sugerem a possibilidade de empregar um meio único para todas as etapas da PIVE [6], o que poderia reduzir variáveis experimentais e melhorar a padronização entre laboratórios. Além disso, o ambiente de cultivo influencia no acúmulo de lipídios citoplasmáticos, característica importante para a qualidade e criotolerância embrionária [7–10], e na flutuação de osmolaridade e pH decorrentes da manipulação frequente e/ou da troca de meios, modificando o metabolismo celular, induzindo estresse osmótico e comprometendo a homeostase intracelular [11,12]. Evidências recentes indicam que o SOF durante a MIV

pode modular positivamente vias associadas à qualidade oocitária e ao metabolismo lipídico [13].

Apesar desses avanços, ainda há escassez de estudos comparando diretamente um protocolo totalmente unificado, utilizando SOF como meio base contínuo em MIV, FIV e CIV, aos protocolos segmentados tradicionalmente empregados (TCM-199–TALP–SOF). A avaliação de um sistema de meio único é particularmente relevante para a padronização da PIVE, considerando seu potencial para reduzir a complexidade operacional e minimizar fontes de variação na produção de embriões. Assim, testamos a hipótese de que o uso de SOF, como meio base, nas etapas de MIV, FIV e CIV é capaz de sustentar níveis de competência oocitária, desenvolvimento embrionário e expressão molecular equivalentes ou superiores aos observados no protocolo tradicional segmentado (TCM-199–TALP–SOF), configurando-se como uma alternativa promissora para maior padronização da PIVE comercial bovina.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de um protocolo de meio único utilizando o SOF como meio contínuo ao longo das etapas da produção *in vitro* de embriões, em comparação a um protocolo tradicional, a fim de determinar a capacidade do meio SOF de sustentar a competência oocitária, a fecundação, o desenvolvimento embrionário e os padrões de expressão molecular.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Recuperação dos complexos cumulus-oócitos (CCOs)

Os ovários foram obtidos de abatedouro e imediatamente após o abate, foram acondicionados em recipiente contendo solução salina estéril à 35°C e transportados até o Laboratório localizado na Universidade do Oeste Paulista, Campus de Presidente Prudente - SP.

No laboratório, os ovários foram lavados em solução salina, esterilizados com álcool 70% e os folículos antrais de 3-8 mm aspirados com agulha hipodérmica 18G (40x12 mm) acoplada à seringa descartável de 10 mL. Após a aspiração, o fluido folicular foi depositado em tubo cônico estéril e mantido em banho-maria a 35°C até a formação do *pellet*, o qual foi depositado em placa de Petri (90 mm) para seleção e classificação dos oócitos quanto à qualidade em microscópio estereoscópio. Os oócitos foram classificados quanto a qualidade em graus I, II e III utilizando o sistema de classificação descrito por Lonergan et al. [14] e distribuídos 25 CCOs aleatoriamente entre os dois grupos: Controle (TCM-199 acrescido de hormônios + 10% de soro fetal bovino) e SOF-MIV (SOF acrescido de hormônios + 10% de soro fetal bovino).

## 2.2 *Maturação in vitro (MIV)*

No grupo controle os oócitos foram maturados em meio base TCM 199 suplementado com 75 µg/mL de amicacina, 4 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA), 0,01 UI/mL de FSHr, 0,001 µg/mL de 17β Estradiol, 1 µM de cisteamina e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Progest Biotecnologia Animal, Botucatu, São Paulo, Brasil); Enquanto os oócitos do grupo SOF-MIV seguiu a formulação de Holm et al. [15] suplementado com 75 µg/mL de amicacina, 4 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA), 0,01 UI/mL de FSHr, 0,001 µg/mL de 17β Estradiol, 1 µM de cisteamina e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Progest Biotecnologia Animal, Botucatu, São Paulo, Brasil).

Nas gotas, contendo 90 µL de meio (controle ou SOF-MIV, descritos acima), foram depositados 20 a 25 oócitos, cobertas por óleo de silicone 200/0350 (Quimesp Química, Guarulhos, SP, Brasil) e mantidos por 22 a 24 horas em incubadora com atmosfera controlada 5% de CO<sub>2</sub> em ar, temperatura de 38,5 °C e umidade máxima.

### 2.3 Expansão das células do cumulus

Antes e após a maturação foi realizado a captura de fotos na lupa trinocular BEL (SZPLED-45X com câmera HDCAMTA-0124-HDL) com ampliação de 50x, para avaliar a expansão das células do *cumulus*, grupo controle (imaturo n = 342; maturo n = 335) e grupo SOF-MIV (imaturo n = 327; maturo n = 345), através da análise da área ( $\mu\text{m}^2$ ) pelo software ImageJ®.

### 2.4 Avaliação de gotículas lipídicas

Após a maturação, os oócitos dos grupos controle (n = 148) e SOF-MIV (n = 147) foram submetidos à avaliação semiquantitativa das gotículas lipídicas citoplasmáticas por meio do método de coloração *Sudan Black*, conforme descrito por Sudano et al. [9]. Os oócitos foram fixados em paraformaldeído a 4% por 30 minutos à temperatura ambiente, lavados em PBS suplementado com PVA (PBS+PVA) e, em seguida, transferidos para gotas de etanol 50% por 2 minutos. Posteriormente, foram corados em solução de Sudan Black B 1% (SIG-199664-25G, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). preparada em etanol 70%, por 1 minuto. Após a coloração, os oócitos foram novamente lavados em etanol 50% e em PBS+PVA, sendo então montados em lâminas contendo 10  $\mu\text{L}$  de glicerol.

A leitura foi realizada em microscópio óptico Leica DM750 equipado com câmera ICC50HD e software LAS 4.2, utilizando aumento de 400 $\times$ . As imagens foram registradas e analisadas quanto à intensidade de cinza utilizando o software ImageJ®.

### 2.5 Maturação nuclear e intensidade mitocondrial

Para esta avaliação, cinco réplicas contendo 30 oócitos por grupo foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em PBS suplementado com PVA (PBS+PVA) e permeabilizados em 200  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 por 15 minutos. Após nova lavagem em PBS+PVA, os oócitos foram

corados com 200  $\mu$ L de MitoTracker Red CMXROs (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) em temperatura ambiente por 20 minutos para posterior lavagem em PBS+PVA e montagem de lâminas contendo glicerol com 10  $\mu$ L de Hoechst 33342 (Invitrogen, Massachusetts, EUA) e coberta com lamínula.

A avaliação foi realizada em microscópio de fluorescência Nexcope NE700 (Prime Life Science MF-BGU-LED-N; câmera Tucsen FL20BW), com aumento de 400 $\times$ , excitação 365nm e emissão 420nm. Os oócitos foram classificados quanto ao estágio meiótico: MI (não extrusão do corpúsculo polar), MII (extrusão do primeiro corpúsculo polar) e degenerados, conforme critérios morfológicos estabelecidos por King et al. [16] para avaliação nuclear em bovinos. Para realizar a avaliação sobre a intensidade da mitocôndria no citoplasma, a fluorescência do MitoTracker foi detectada de acordo com o espectro específico do corante utilizado, usando o mesmo microscópio Nexcope NE700 (Prime Life Science MF-BGU-LED-N; câmera Tucsen FL20BW), com aumento de 400 $\times$ , com excitação de 579 nm e emissão de 599 nm. Os resultados foram tratados pelo Software ImageJ<sup>®</sup>.

## 2.6 Fertilização *in vitro* (FIV)

Para a fertilização, os oócitos maturados foram transferidos para o meio de FIV correspondente a cada grupo experimental. No grupo controle, utilizou-se meio TALP composto por TL Stock suplementado com BSA (6 mg/mL), piruvato (2  $\mu$ L/mL da solução 100 mM), gentamicina (75  $\mu$ g/mL), heparina (30  $\mu$ g/mL) e solução PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina; 44  $\mu$ L/mL) (Progest Biotecnologia Animal, Botucatu, São Paulo, Brasil). Para o grupo SOF-FIV, a formulação seguiu Holm et al. [15], contendo os mesmos suplementos utilizados no grupo controle (Progest Biotecnologia Animal, Botucatu, São Paulo, Brasil).

Foram utilizadas palhetas de sêmen de um único touro e partida (Tairana, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil), armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C). O

descongelamento foi realizado em água a 36 °C por 30 segundos, seguido de seleção espermática por centrifugação em gradiente de Percoll (90% e 45%), diluído para  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml e adicionado a cada gota de fertilização contendo os CCOs (7 µl de sêmen/gota). A co-incubação ocorreu por 18 horas em incubadora com condições controladas.

## 2.7 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após a FIV, os prováveis zigotos de ambos os grupos foram desnudados para remoção das células do *cumulus* e transferidos para gotas de 100 µL de meio de cultivo (CIV) à base de SOF suplementado com 2,5% de soro fetal bovino (SFB) e piruvato (2 mM) (Progest Biotecnologia Animal, Botucatu, São Paulo, Brasil). O cultivo foi realizado por sete dias em incubadora com temperatura e atmosfera controlada.

A taxa de clivagem foi avaliada 72 horas após a FIV (D3), seguida do primeiro *feeding*, no qual metade do meio (50 µL) foi substituída. No D5, procedeu-se o segundo *feeding*. Ao final do período de cultivo, os embriões foram avaliados quanto à taxa de desenvolvimento, estágio, qualidade morfológica e armazenados em -80 °C para expressão gênica.

## 2.8 Expressão gênica

A extração de RNA dos embriões, cinco repetições contendo cinco embriões cada, foi realizada utilizando o *kit* Arcturus™ PicoPure™ RNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. As concentrações de RNA total foram determinadas por espectrofotometria e fluorimetria (Nanodrop ND-2000®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O RNA extraído foi tratado com DNase I (Invitrogen, São Paulo, Brasil) para remoção de possível contaminação por DNA genômico e, posteriormente, submetido à transcrição reversa utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil).

A quantificação de RNAm foi realizada por RT-qPCR utilizando o sistema Power SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Para

a normalização dos dados foi utilizado a média geométrica dos genes de referência *PPIA* e *ACTB*, sendo os níveis de estabilidade determinados pelo software NormFinder® [17]. A média do grupo controle foi adotada como calibrador para o cálculo do  $\Delta\Delta C_t$ , e os resultados foram expressos como *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). Os genes avaliados estão listados na Tabela 1 [18].

## 2.9 Análise estatística

Inicialmente, os dados expressos em porcentagem (Hoechst, clivagem e produção de blastocistos) foram submetidos à transformação arco-seno. Em seguida, todas as variáveis transformadas foram avaliadas quanto à normalidade da distribuição por meio do teste de Shapiro–Wilk. A maioria dos dados apresentou distribuição normal e foram comparados utilizando o teste *t* de Student. As variáveis referentes à expansão das células do *cumulus* e à expressão gênica de *BAX* e *SOD1* não atenderam ao pressuposto de normalidade e, portanto, foram comparadas pelo teste de Mann–Whitney U. Todas as análises foram expressas como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e adotou-se o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas no programa JMP versão 7.0 (SAS).

Tabela 1. Sigla do gene, nome da proteína, sequências dos primers direto (F) e reverso (R) e função dos genes quantificados por qPCR em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*.

| Sigla         | Nome                       | Sequência de primer direta (F) e reversa (R) |                          | Via biológica |
|---------------|----------------------------|----------------------------------------------|--------------------------|---------------|
| <i>PPIA</i>   | Peptidylprolyl Isomerase A | F                                            | GCCATGGAGCGCTTTGG        | referência    |
|               |                            | R                                            | CCACAGTCAGCAATGGTTATCT   |               |
| <i>ACTB</i>   | Beta-Actin                 | F                                            | CGAGATTGGCATGGCTTTATTC   | referência    |
|               |                            | R                                            | ACCTTCACCGTTCCAGTTT      |               |
| <i>CASP03</i> | Caspase 03                 | F                                            | AACAGTCAGTCAGTCAGTTGGGCA | apoptose      |
|               |                            | R                                            | ACACACACCCGTAGCTGTGAAGAA |               |
| <i>BCL2</i>   | BCL2 apoptosis regulator   | F                                            | TTCGCCGAGATGTCCAGTCAGC   | apoptose      |
|               |                            | R                                            | TGTACGCTCTCCACACACA      |               |
| <i>BAX</i>    | BCL-2 associated protein X | F                                            | TGTTTTCTGACGGCAACTTCA    | apoptose      |
|               |                            | R                                            | CGAAFFAAGTCCAATGTCCAG    |               |
| <i>GPXI</i>   | Glutathione peroxidase 1   | F                                            | GGGACTACACCCAGATGAATGA   | antioxidante  |
|               |                            | R                                            | GCATAAAGTTGGGCTCGAA      |               |

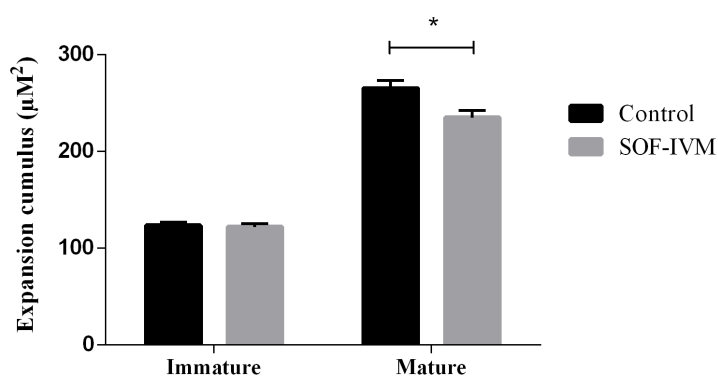
|               |                                                         |   |                           |                      |
|---------------|---------------------------------------------------------|---|---------------------------|----------------------|
| <i>SOD1</i>   | Superoxide dismutase 1, soluble                         | F | AAGGCCGTCTGCGTGCTGAA      | estresse oxidativo   |
|               |                                                         | R | CAGGTCTCCAACATGCCTCT      |                      |
| <i>SOD2</i>   | Superoxide dismutase 2, mitochondrial                   | F | AGCACGAGCAGGAGACTGGT      | estresse oxidativo   |
|               |                                                         | R | GACGTTGAGGTTGTTACGTTAG    |                      |
| <i>CPT1B</i>  | carnitine palmitoyltransferase 1B                       | F | CTGCTGAGAAGCACCAGAATA     | estresse oxidativo   |
|               |                                                         | R | GGTACTTGGAGACCACGTAAAG    |                      |
| <i>SCD1</i>   | Stearoyl-CoA desaturase                                 | F | GACCCTGGGCAAGTCATTTA      | metabolismo lipídico |
|               |                                                         | R | AAACTGCCCTTTGAGGTAGG      |                      |
| <i>SREBF1</i> | Sterol regulatory element binding transcription fator 1 | F | GACTACATCCGCTTCCTTCAG     | metabolismo lipídico |
|               |                                                         | R | CCAGGTCCTTCAGCGATT        |                      |
| <i>SLC2A1</i> | solute carrier family 2 member 1                        | F | CAGGAGATGAAGGAGGAGAGC     | metabolismo lipídico |
|               |                                                         | R | CACAAATAGCGACACGACAGT     |                      |
| <i>VEGF</i>   | Vascular endotelial growth factor                       | F | CCCAGATGAGATTGAGTTTCAATTT | implantação          |
|               |                                                         | R | ACCGCCCTGGCTTGTCAC        |                      |

### 3. Resultados

#### 3.1 Expansão do complexo cumulus oócito (CCO)

Não houve diferença na área das células do *cumulus* compactas em oócitos imaturos antes da maturação em meio controle (TCM-199) e meio SOF-MIV. Após 24 horas de maturação, a expansão das células do *cumulus* foi maior ( $p=0,0010$ ) em CCO's maturados em meio TCM-199 (controle).

A)



B)

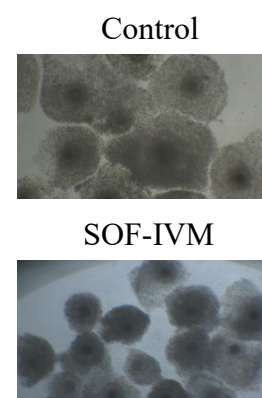


Fig. 1. Expansão das células do *cumulus* em oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* em meio controle (TCM-199) e em meio SOF-MIV. A) Quantificação da expansão das células do *cumulus* (média  $\pm$  EPM) analisada por meio do software ImageJ® em oócitos imaturos e após 24 horas de maturação *in vitro* nos grupos controle (imaturo, n = 342; maturo, n = 335) e SOF-MIV (imaturo, n = 327; maturo, n = 345). Asterisco (\*) indica diferença significativa entre os grupos (p = 0,0010). B) Oócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 horas (aumento de 50 $\times$ ).

173

### 174 3.2 Avaliação de gotículas lipídicas

175 Não foram observadas diferenças (p = 0,87) no conteúdo lipídico citoplasmático dos  
176 oócitos maturados *in vitro* no grupo SOF-MIV quando comparado ao TCM-199 (Fig. 2).

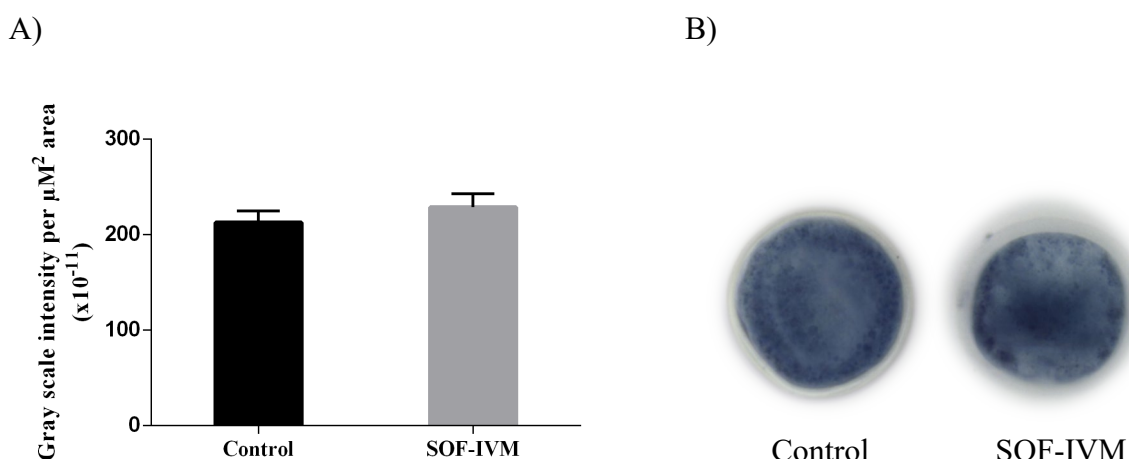


Fig. 2. Avaliação do conteúdo lipídico em oócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 horas em meio controle e em meio SOF-MIV. A) Intensidade da escala de cinza (média  $\pm$  EPM) analisada por meio do software ImageJ® (controle, n = 148; SOF-MIV, n = 147; p = 0,87). B) Coloração por Sudan Black, na qual os pontos pretos representam gotículas lipídicas citoplasmáticas.

### 177 3.3 Avaliação da maturação nuclear

O uso do meio SOF na MIV resultou em maior taxa de oócitos maturados ( $p = 0,01$ ) e menor taxa de oócitos degenerados ( $p = 0,05$ ) quando comparado ao TCM-199 (Tabela 2).

Tabela 2. Fases de maturação nuclear (média  $\pm$  EPM) de oócitos bovinos maturados em meio controle ( $n = 150$ ) e em meio SOF-MIV ( $n = 154$ ), avaliadas por meio da coloração Hoechst 33342.

| Stage | Control ( $n = 150$ ) | SOF-IVM ( $n = 154$ ) | p value |
|-------|-----------------------|-----------------------|---------|
| M1    | $37,62 \pm 6,32$      | $25,39 \pm 2,23$      | 0,10    |
| M2    | $43,91 \pm 4,38$      | $64,63 \pm 4,52$      | 0,01*   |
| Deg   | $18,46 \pm 2,94$      | $9,96 \pm 2,50$       | 0,05*   |

\* Diferença significativa pelo teste  $t$  de Student.

### 3.4 Avaliação da intensidade mitocondrial

A intensidade mitocondrial do grupo controle foi maior ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo SOF-MIV.

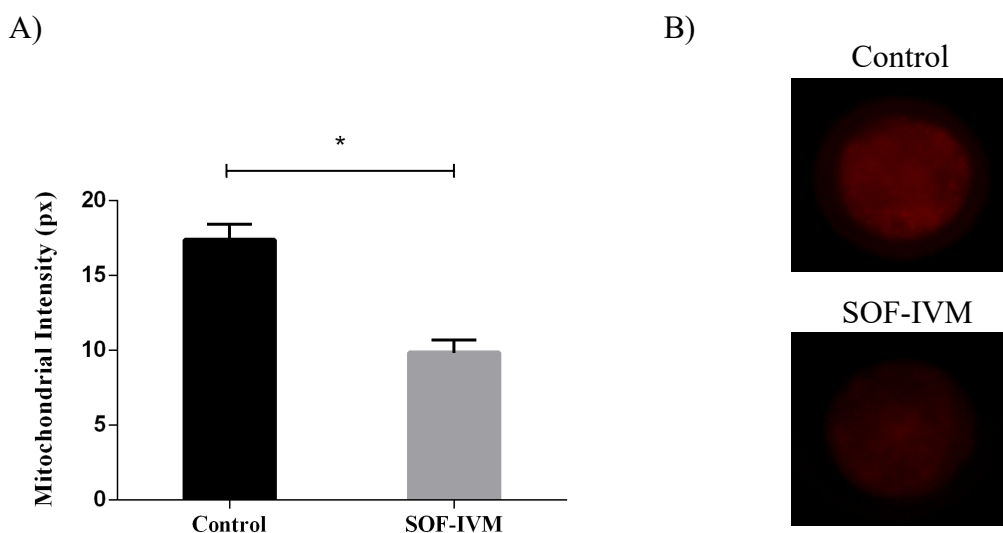


Fig. 3. A) Avaliação da intensidade mitocondrial (média  $\pm$  EPM) em oócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 horas em meio controle ( $n = 150$ ) e em meio SOF-MIV ( $n = 154$ )

analisados pelo software ImageJ®. B) Coloração por MitoTracker Red CMXROs, na qual a cor avermelhada representa a presença de mitocôndrias. Asterisco (\*) indica diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ )

### 3.5 Avaliação da taxa de clivagem e blastocisto

Não foram observadas diferenças entre o grupo SOF e o controle quanto às taxas de clivagem no dia 3 pós-fertilização ( $p = 0,74$ ) e de blastocistos no dia 7 ( $p = 0,54$ ).

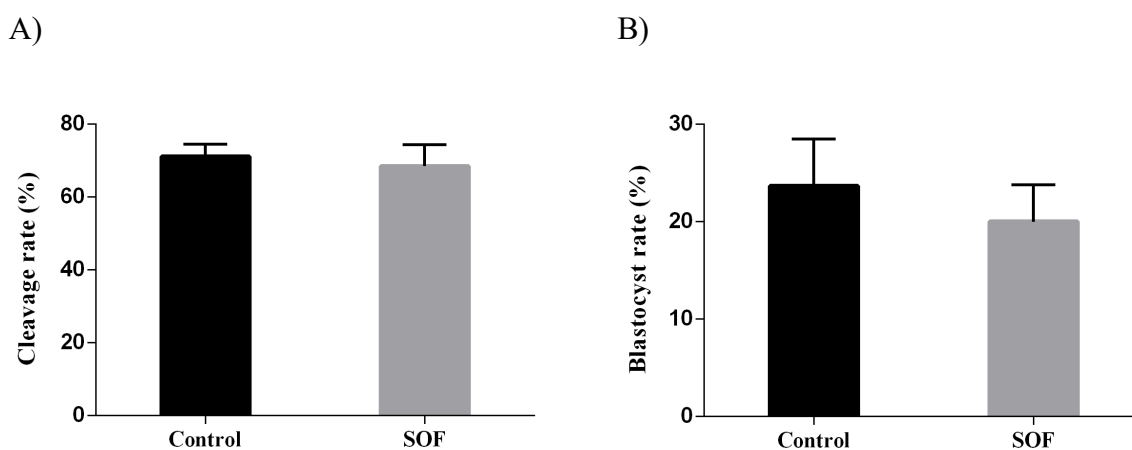


Fig. 4. Desenvolvimento embrionário após fertilização *in vitro* em meio controle e em meio SOF. A) Taxa de clivagem (média  $\pm$  EPM) nos grupos controle ( $n = 328$ ) e SOF ( $n = 325$ ), avaliada 72 horas após a fertilização *in vitro*. B) Taxa de blastocistos (média  $\pm$  EPM) nos grupos controle ( $n = 328$ ) e SOF ( $n = 325$ ), avaliada sete dias após a fertilização *in vitro*.

### 3.6 Expressão Gênica

A expressão dos genes relacionados ao metabolismo lipídico (SLC2A1, SREBF1 e SCD1), apoptose (BCL2, BAX e CASP03), estresse oxidativo (GPX1, SOD1, SOD2 e CPT1B) e implantação embrionária (VEGF) não diferiu entre os grupos SOF e controle.

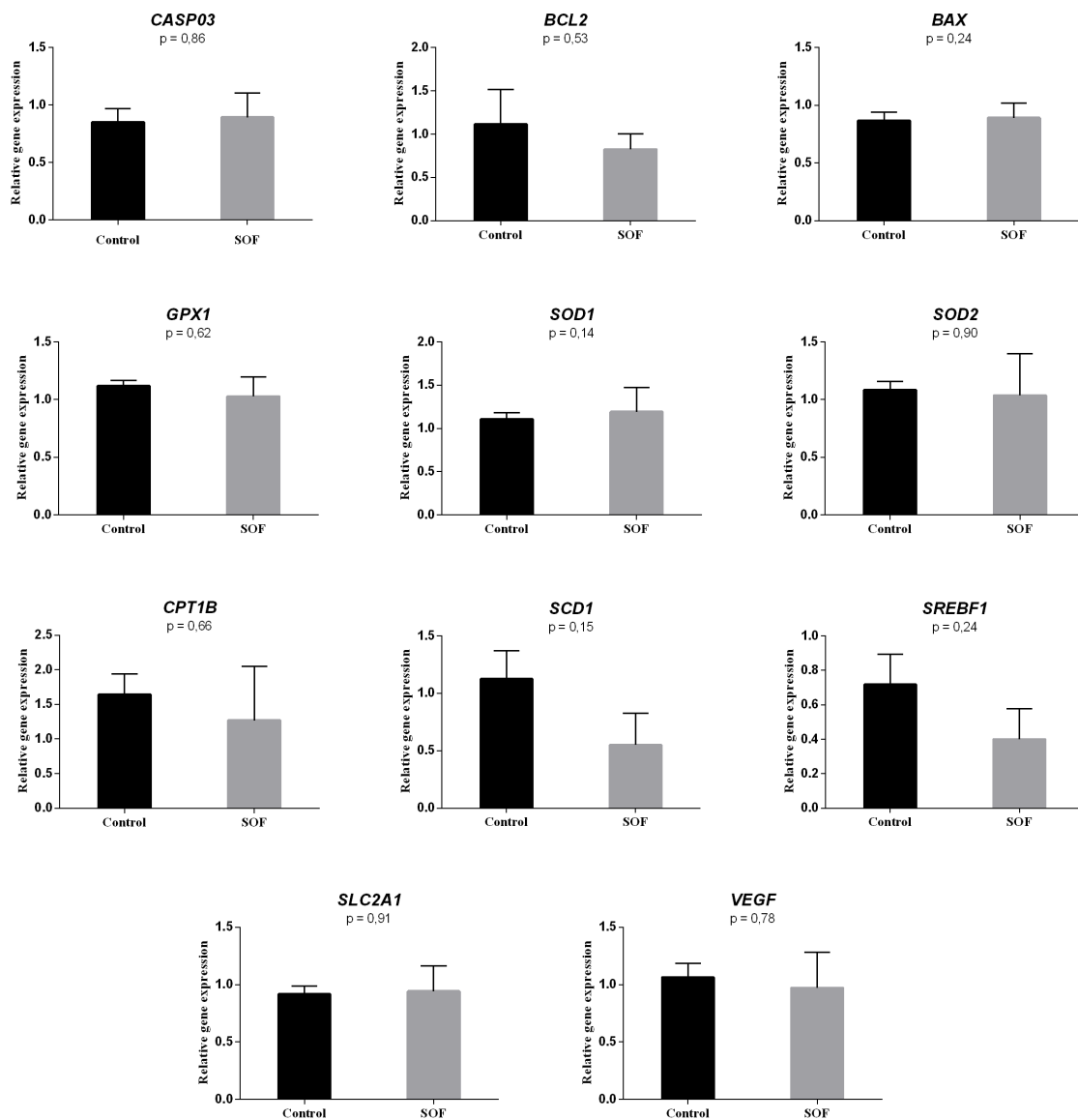


Fig. 5. Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo lipídico, apoptose, estresse oxidativo e implantação embrionária em embriões cultivados por sete dias nos grupos controle (n = 25) e SOF (n = 25). A expressão gênica foi normalizada pela média geométrica dos genes de referência PPIA e ACTB, utilizando o método  $\Delta\Delta Ct$ .

#### 4. Discussão

O uso de um meio único nas etapas da produção in vitro de embriões representa uma estratégia relevante para a otimização de custos, tempo operacional e controle de variáveis

laboratoriais. No presente estudo, a utilização do meio SOF durante a maturação oocitária resultou em maior maturação nuclear até a metáfase II, associada a menor degeneração e baixa intensidade mitocondrial que, juntamente com a baixa expansão das células do *cumulus* observada nesse grupo, o desempenho embrionário subsequente foi semelhante ao do grupo controle, conforme evidenciado pela clivagem e a produção de blastocistos, bem como pela ausência de diferenças nas gotículas lipídicas e na expressão dos genes avaliados. Esses resultados indicam que a redução da expansão do *cumulus* e da intensidade mitocondrial não comprometeu a competência oocitária nem os eventos iniciais do desenvolvimento embrionário, reforçando a viabilidade do meio SOF como alternativa funcional em todas as etapas da PIVE.

A etapa de MIV é crucial para o desenvolvimento embrionário subsequente, uma vez que oócitos maturados de forma inadequada apresentam comprometimento na competência de fertilização e na capacidade de originar embriões viáveis [2,19,20]. A expansão das células do *cumulus* é amplamente utilizada como marcador indireto da competência oocitária, por meio da troca de moléculas sinalizadoras, fundamentais para sua maturação e capacidade de desenvolvimento [20,21]. No entanto, os resultados do presente estudo indicam que uma menor expansão do *cumulus*, como observada no grupo SOF, não necessariamente se traduz em prejuízo funcional ao oócito. Apesar da expansão menor que no TCM-199, os oócitos maturados no SOF foram capazes de completar a maturação nuclear de forma mais eficiente, atingindo a metáfase II em maior proporção e apresentando menor degeneração, além de trazer resultados semelhantes ao grupo controle de clivagem e produção de blastocistos, o que reforça que a competência oocitária não depende exclusivamente do grau de expansão do *cumulus*.

A maturação oocitária compreende uma sequência complexa e altamente coordenada de eventos de maturação nuclear e citoplasmática, sendo a progressão meiótica um dos

principais indicadores da competência do oócito para a fertilização [22]. A retomada da meiose, interrompida em prófase I desde a fase de organogênese, culmina na metáfase II, estágio no qual o oócito adquire plena aptidão para ser fertilizado [23,24]. Durante esse processo, o oócito progride do estágio caracterizado pela presença da vesícula germinativa até a metáfase II, considerada o marco final da maturação nuclear [24]. Embora estudos prévios relatem taxas de maturação nuclear em metáfase II entre 80 e 90% em oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* [23–25], no presente estudo o grupo controle apresentou apenas 43,9% de oócitos nesse estágio. Essa diferença pode ser atribuída, em parte, à variabilidade das características das fêmeas doadoras, incluindo raça, idade e estado fisiológico, fatores estes associados à competência oocitária e à eficiência da maturação nuclear durante a maturação *in vitro*. Apesar desse cenário, o meio SOF suplementado com hormônios promoveu um aumento significativo de aproximadamente 21% na taxa de oócitos em metáfase II, indicando que sua composição foi capaz de favorecer os eventos intracelulares necessários à maturação nuclear, mesmo na presença de menor expansão do *cumulus*.

Na maturação citoplasmática, as mitocôndrias desempenham um papel central na competência oocitária, integrando o metabolismo bioenergético às vias de sinalização intracelular necessárias para a progressão meiótica. Por meio da fosforilação oxidativa, essas organelas produzem o ATP necessário para a maturação nuclear e citoplasmática, ao mesmo tempo em que regulam a homeostase do cálcio, o equilíbrio redox e a sinalização apoptótica. Assim, a funcionalidade mitocondrial é considerada um determinante crítico da qualidade oocitária e da competência de desenvolvimento [26,27]. No presente estudo, os oócitos maturados no grupo SOF apresentaram menor intensidade de fluorescência do MitoTracker Red CMXRos em comparação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ), sugerindo redução do potencial de membrana mitocondrial, parâmetro este amplamente utilizado como indicador da

atividade funcional das mitocôndrias [27]. Entretanto, essa diminuição não foi acompanhada por prejuízo à clivagem e à produção de blastocistos, indicando que o meio SOF pode ter promovido uma modulação da atividade mitocondrial sem comprometer a capacidade bioenergética necessária para a maturação oocitária e o desenvolvimento inicial do embrião. Considerando a maior proporção de oócitos em metáfase II e a menor taxa de degeneração observadas neste estudo, é possível que o tratamento tenha favorecido um estado metabólico mais equilibrado, no qual a atividade mitocondrial foi suficiente para atender às demandas energéticas celulares, sem promover ativação excessiva da cadeia respiratória e consequente aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), sem limitar a produção de ATP [26,27].

Esses achados sugerem que o meio SOF foi capaz de sustentar adequadamente o metabolismo energético do complexo *cumulus*–oócito. A progressão meiótica depende diretamente das reservas energéticas, especialmente dos triglicerídeos, que são metabolizados pelas mitocôndrias para a produção de ATP e espécies reativas de oxigênio (EROs) [28]. Os lipídios, além de essenciais para o desenvolvimento embrionário, são armazenados sob a forma de gotículas lipídicas, atuando como um reservatório energético controlado e protegendo o oócito contra danos associados ao excesso lipídico durante a maturação e a criopreservação [29,30].

O conteúdo de gotículas lipídicas dos oócitos, conforme demonstrado pela coloração com Sudan Black, não diferiu entre os meios. Esse resultado indica que o meio SOF manteve o equilíbrio lipídico celular, diferentemente do que ocorre em alguns sistemas de cultivo *in vitro*, nos quais o excesso de lipídios está associado à composição do meio, como a presença de soro fetal bovino [28]. Dessa forma, a maior maturação nuclear observada no grupo SOF pode estar relacionada à utilização mais eficiente das reservas energéticas, e não à quantidade absoluta de lipídios acumulados. Essa equivalência funcional também foi corroborada pela análise da expressão gênica. Os genes relacionados ao metabolismo lipídico, apoptose e

implantação embrionária não apresentaram diferenças entre os grupos, indicando que o uso do meio SOF ao longo das três fases da produção *in vitro* não comprometeu a qualidade molecular dos embriões. Genes como *SLC2A1*, *SREBF1* e *SCD1* desempenham papéis fundamentais no metabolismo energético e lipídico durante o desenvolvimento embrionário [31,32], enquanto *CPT1B* está associado à  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e à melhoria da qualidade embrionária [33]. A expressão desses genes reforça que o meio SOF atende adequadamente às demandas metabólicas do embrião em desenvolvimento.

De forma semelhante, não foram observadas alterações na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e à apoptose, como *BAX*, *CASP03*, *BCL2*, *SOD* e *GPX*. Sabe-se que o excesso de EROs pode induzir apoptose e comprometer a qualidade embrionária, sendo que embriões de baixa qualidade apresentam maior expressão de genes pró-apoptóticos [34,35]. A ausência de diferenças entre os grupos indica que o meio SOF não aumentou o estresse oxidativo nem a apoptose, reforçando sua segurança para uso como meio único.

Em relação à implantação embrionária, a expressão do *VEGF*, gene fundamental para o desenvolvimento embrionário e para a comunicação embrião endométrio [36], não diferiu entre os grupos, sugerindo que o meio SOF não compromete o potencial de implantação.

Em conjunto, os resultados demonstram que, o meio SOF favorece a maturação nuclear, reduz a degeneração oocitária, mesmo com menor expansão das células do *cumulus*, além disso mantém a clivagem e produção de blastocisto e o padrão de expressão gênica em níveis equivalentes ao meio padrão. Assim, o meio SOF pode ser considerado um meio único eficiente, capaz de atender às exigências metabólicas, estruturais e moleculares das etapas de MIV, FIV e CIV na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Embora os resultados indiquem que o meio SOF pode ser utilizado como meio base único na PIVE, estudos adicionais são necessários para confirmar a funcionalidade desses

embriões, especialmente por meio da avaliação das taxas de prenhez após a inovulação. Além disso, considerando a relação entre metabolismo lipídico, equilíbrio redox e criotolerância embrionária, estudos futuros avaliando o desempenho desses embriões após a criopreservação e subsequente transferência embrionária poderão consolidar o meio SOF como uma alternativa viável e eficiente para a produção *in vitro* de embriões bovinos.

## 5. Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que o meio SOF pode ser empregado de forma eficaz como meio base único nas etapas de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, sem prejuízo à competência oocitária ou ao desenvolvimento embrionário. A manutenção da clivagem e da produção de blastocistos, associada à ausência de alterações na expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, ao estresse oxidativo, à apoptose e a marcadores de implantação embrionária, sustenta o uso do SOF como uma alternativa funcional, consistente e segura aos protocolos convencionais de PIVE.

## Declaração de contribuição de autorização CREDiT

**Amanda Talys Sampaio:** Redação – revisão e edição, Redação – rascunho original, Metodologia, Investigação, Análise formal, Curadoria de dados, Obtenção de financiamento. **Raquel Zaneti Puelker:** Recursos, Conceitualização, Metodologia. **Bruno Henrique Couto Oliveira:** Metodologia, Investigação. **Rafael Martins Tonzar:** Metodologia, Investigação. **Natalia Vitor dos Santos:** Metodologia, Investigação. **Maria Eduarda Campos Ferreira:** Metodologia, Investigação. **Caroline Schiavão Fernandes:** Metodologia, Curadoria de dados. **Bruno Carrino Suave:** Metodologia, Curadoria de dados. **Anthony Cesar de Souza Castilho:** Metodologia, Curadoria de dados, Análise formal. **Caliê Castilho:** Redação –

330    revisão e edição, Redação – rascunho original, Supervisão, Metodologia, Administração do  
331    projeto, Investigação, Análise formal, Curadoria de dados, Conceitualização.

332

### 333    **Declaração de conflito de interesses**

334            Os autores declaram que não há conflito de interesses.

335

### 336    **Agradecimentos**

337            O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de  
338    Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS

- [1] Mello RRC, Ferreira JE, Sousa SLG de, Mello MRB de, Palhano HB. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. Rev Bras Reprod Anim. 2016;40(2):58–64.
- [2] del Collado M, Da Silveira JC, Oliveira MLF, Alves BMSM, Simas RC, Godoy AT, *et al.* *In vitro* maturation impacts cumulus–oocyte complex metabolism and stress in cattle. Reproduction. 2017;154(6):881–93. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0134>.
- [3] Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, *et al.* Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. Biol Reprod. 2000;62(2):355–64. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.355>.
- [4] Carolan C, Lonergan P, Van Langendonck A, Merrilod P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Theriogenology. 1995;43(6):1115–28. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00075-J](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00075-J).
- [5] Lizarraga C, Gaxiola SM, Castro Del Campo N, Enriquez-Verduzco I, Rodriguez-Gaxiola MA, Montero-Pardo A, *et al.* Scoping review of primary studies evaluating Bovine *in vitro* oocyte maturation and embryo development. Veterinaria Mexico AO. 2024;11. <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2024.1315>.
- [6] Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. Human Reproduction. 2000;15(2):395–401. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.2.395>.
- [7] Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. Mol Reprod Dev. 2002;61(1):57–66. <https://doi.org/10.1002/mrd.1131>.
- [8] Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservation of embryos. Theriogenology. 1996;45:17–26. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00351-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00351-8).
- [9] Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, *et al.* Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in bos taurus indicus and bos taurus taurus *in vitro*- and in vivo-produced blastocysts. Biol Reprod. 2012;87(6):130, 1-11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102897>.

- [10] Paschoal DM, Sudano MJ, Guastali MD, Dias Maziero RR, Crocomo LF, Oña Magalhães LC, *et al.* Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote*. 2012;22(2):146–57. <https://doi.org/10.1017/S0967199412000354>.
- [11] Sciorio R, Rinaudo P. Culture conditions in the IVF laboratory: state of the ART and possible new directions. *J Assist Reprod Genet*. 2023;40(11):2591–607. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02934-5>.
- [12] Krisher RL, Herrick JR. Bovine embryo production *in vitro*: evolution of culture media and commercial perspectives. *Anim Reprod*. 2024; 21(3):e20240051. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2024-0051>.
- [13] Mendes AF, Puelker RZ, De Souza LFA, Jacintho ARC, Dos Santos PH, Giometti IC, *et al.* *In vitro* maturation in synthetic oviductal fluid increases gene expression associated with quality and lipid metabolism in bovine oocytes. *Zygote*. 2023;31(6):582–7. <https://doi.org/10.1017/S0967199423000473>.
- [14] Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and Embryo Quality: Effect of Origin, Culture Conditions and Gene Expression Patterns. *Reprod Domest Anim*. 2003;38:259–67. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00437.x>.
- [15] Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. 1999;52(4):683–700. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00162-4).
- [16] King WA, Bousquet D, Greve T, Goff AK. Meiosis in bovine oocytes matured *in vitro* and in vivo. *Acta Vet Scand*. 1986;27(2):267–79. <https://doi.org/10.1186/BF03548171>.
- [17] Andersen CL, Jensen JL, Falck Ørntoft T. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004;64(15):5245–50. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.
- [18] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- [19] Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML, First NL. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos.

- 415 Biol Reprod. 1988;39(3):546–52.  
416 <https://doi.org/10.1095/biolreprod39.3.546>.
- 417 [20] Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, De Kruif A.  
418 Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte  
419 maturation, ovulation, and fertilization. Mol Reprod Dev.  
420 2002;61(3):414–24. <https://doi.org/10.1002/mrd.10102>.
- 421 [21] Huang Z, Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship:  
422 New insights from the cumulus cell transcriptome. Mol Hum Reprod.  
423 2010;16(10):715–25. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq031>.
- 424 [22] Tukur HA, Aljumaah RS, Swelum AAA, Alowaimer AN, Saadeldin IM.  
425 The making of a competent oocyte – a review of oocyte development and  
426 its regulation. Journal of Animal Reproduction and Biotechnology.  
427 2020;35(1):2–11. <https://doi.org/10.12750/jarb.35.1.2>.
- 428 [23] Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function  
429 in mammals. Reproduction. 2001;122:829–38.  
430 <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220829>.
- 431 [24] Conti M, Franciosi F. Acquisition of oocyte competence to develop as an  
432 embryo: Integrated nuclear and cytoplasmic events. Hum Reprod Update.  
433 2018;24(3):245–66. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx040>.
- 434 [25] Ferré LB, Kjelland ME, Taiyeb AM, Campos-Chillon F, Ross PJ. Recent  
435 progress in bovine *in vitro*-derived embryo cryotolerance: Impact of *in*  
436 *vitro* culture systems, advances in cryopreservation and future  
437 considerations. Reproduction in Domestic Animals. 2020;55(6):659–76.  
438 <https://doi.org/10.1111/rda.13667>.
- 439 [26] Zhang YR, Xu DJ. Mitochondrial quality control in bovine oocyte  
440 maturation: mechanisms, challenges, and prospects for enhancing  
441 reproductive efficiency. Animals. 2025;15(13):2000.  
442 <https://doi.org/10.3390/ani15132000>.
- 443 [27] Yang Z, Liu S, Pan X. Research progress on mitochondrial damage and  
444 repairing in oocytes: A review. Mitochondrion. 2024;75:101845.  
445 <https://doi.org/10.1016/j.mito.2024.101845>.
- 446 [28] Dunning KR, Russell DL, Robker RL. Lipids and oocyte developmental  
447 competence: The role of fatty acids and  $\beta$ -oxidation. Reproduction.  
448 2014;148(1):R15–R27. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0251>.
- 449 [29] Melo-Sterza F de A, Poehland R. Lipid metabolism in bovine oocytes and  
450 early embryos under *in vivo*, *in vitro*, and stress conditions. Int J Mol Sci.  
451 2021;22(7):3421. <https://doi.org/10.3390/ijms22073421>.

- [30] Saraiva NZ, Oliveira CS, Quintão CCR, Camargo LS de A. Avaliação do acúmulo lipídico em embriões bovinos. *Embrapa* 2023;01–21.
- [31] Wrenzycki C, Herrmann D, Keskinetepe L, Martins A, Sirisathien S, Brackett B, *et al.* Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod.* 2001;16(5):893–901. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.893>.
- [32] Sanchez-Lazo L, Brisard D, Elis S, Maillard V, Uzbekov R, Labas V, *et al.* Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Mol Endocrinol.* 2014;28(9):1502–21. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1049>.
- [33] Gentile L, Monti M, Sebastiano V, Merico V, Nicolai R, Calvani M, *et al.* Single-cell quantitative RT-PCR analysis of *Cpt1b* and *Cpt2* gene expression in mouse antral oocytes and in preimplantation embryos. *Cytogenet Genome Res.* 2004;105(2-4):215–21. <https://doi.org/10.1159/0000781>.
- [34] Yang MY, Rajamahendran R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Anim Reprod Sci.* 2002;70(3–4):159–69. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00186-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00186-5).
- [35] Yang M, Tao J, Chai M, Wu H, Wang J, Li G, *et al.* Melatonin improves the quality of inferior bovine oocytes and promoted their subsequent IVF embryo development: Mechanisms and results. *Molecules.* 2017; 22(12):2059. <https://doi.org/10.3390/molecules22122059>.
- [36] Guo X, Yi H, Li TC, Wang Y, Wang H, Chen X. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human embryo implantation: Clinical implications. *Biomolecules.* 2021;11(2):253. <https://doi.org/10.3390/biom11020253>.

479  
480

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

25/11/2025, 14:16

Sistema Gestor de Pesquisa - SGP - Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação  
PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

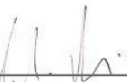
Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "USO DE FLUIDO OVIDUTAL SINTÉTICO (SOF) EM TODAS AS ETAPAS DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE) BOVINOS PROVENIENTE DE OÓCITOS DE ABATEDOURO", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o nº 8693 e tendo como participante(s) AMANDA TALYS SAMPAIO (discente), BRUNO HENRIQUE COUTO OLIVEIRA (discente), ERICK SHIMURA KAWAUSHI (discente), ISADORA HELENA ALONSO LOPES (discente), NATHALY HAYASHI KOMATSU (discente), MARIA EDUARDA CAMPOS FERREIRA (discente), CALIE CASTILHO SILVESTRE (docente responsável), foi avaliado e Aprovado pelo Comitê Assessor de Pesquisa Institucional (CAPI), Comissão de Ética Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

CADÁVERES, PARTES OU AMOSTRAS BIOLÓGICAS COM OUTRAS ORIGENS

| Tipo                                                                                                                        | Outros |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Cadáveres ou parte deles oriundos das atividades de matadouros, frigoríficos, abatedouros ou produtores rurais para consumo |        |
| Cadáveres ou parte deles oriundos das atividades de matadouros, frigoríficos, abatedouros ou produtores rurais para consumo |        |

Presidente Prudente, domingo, 2 de junho de 2024.

  
Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.  
Docente Responsável pela CPDI

  
Prof. Dr. Felipe Rydygier de Ruediger  
Coordenador da CEUA - UNOESTE

## ANEXO B – NORMAS DA REVISTA

### Redação e formatação

#### Formato do arquivo

- Solicitamos que você forneça os arquivos-fonte editáveis de toda a sua submissão (incluindo figuras, tabelas e gráficos de texto). Algumas diretrizes:
- Salve os arquivos em um formato editável, usando a extensão .doc/.docx para arquivos do Word e .tex para arquivos LaTeX. Um arquivo PDF não é aceitável como fonte.
- Formate os arquivos do Word em um layout de coluna única. A formatação de coluna dupla é permitida apenas para trabalhos em LaTeX.
- Remova todo o texto riscado e sublinhado do seu manuscrito, a menos que tenha relevância científica relacionada ao seu artigo.
- Use as funções de verificação ortográfica e gramatical para evitar erros.

Recomendamos que você leia nosso guia passo a passo para publicar com a Elsevier.

#### Página de título

É necessário incluir as seguintes informações na página de título:

- Título do artigo. Os títulos dos artigos devem ser concisos e informativos. Evite abreviações e fórmulas, sempre que possível, a menos que sejam amplamente conhecidas e compreendidas, como por exemplo, DNA.
- Nomes dos autores. Forneça o(s) nome(s) e sobrenome(s) de cada autor. A ordem dos autores deve corresponder à ordem no sistema de submissão. Verifique cuidadosamente se todos os nomes estão escritos corretamente. Se necessário, você pode adicionar seu nome entre parênteses, em sua própria grafia, após a transliteração para o inglês.
- Afiliações. Adicione os endereços de afiliação, indicando onde o trabalho foi realizado, abaixo dos nomes dos autores. Indique as afiliações usando uma letra minúscula sobrescrita imediatamente após o nome do autor e antes do endereço correspondente. Certifique-se de fornecer o endereço postal completo de cada instituição afiliada, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.
- Autor correspondente. Indique claramente quem será responsável pela correspondência relativa ao seu artigo em todas as etapas do processo de revisão por pares e publicação, bem como após a publicação. Essa responsabilidade inclui responder a quaisquer dúvidas futuras sobre seus

resultados, dados, metodologia e materiais. É importante que o endereço de e-mail e os dados de contato do autor correspondente sejam mantidos atualizados durante o processo de submissão e publicação.

- Endereço atual/permanente. Se um autor mudou-se desde a realização do trabalho descrito no artigo, ou se o autor estava em visita durante esse período, um "endereço atual" (ou "endereço permanente") pode ser indicado em uma nota de rodapé ao lado do nome do autor. O endereço onde o autor realizou o trabalho deve ser mantido como seu endereço de afiliação principal. Utilize numerais arábicos sobrescritos para essas notas de rodapé.

## **Resumo**

É necessário apresentar um resumo conciso e objetivo, com no máximo 250 palavras. O resumo deve descrever sucintamente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e as conclusões mais relevantes. Algumas diretrizes:

- Os resumos devem ser autossuficientes, pois geralmente são apresentados separadamente do artigo.
- Evite referências. Caso seja imprescindível incluir alguma, certifique-se de citar o(s) autor(es) e o(s) ano(s).
- Evite abreviações não padronizadas ou incomuns. Caso seja imprescindível incluir alguma, certifique-se de que ela seja definida no resumo logo na primeira vez em que for mencionada.

## **Palavras-chave**

Você deve fornecer de 1 a 7 palavras-chave para fins de indexação. As palavras-chave devem ser escritas em inglês. Por favor, evite palavras-chave compostas por várias palavras (usando "e" ou "de").

Recomendamos que você utilize abreviações em palavras-chave somente se elas forem amplamente utilizadas na área.

## **Destaques**

É recomendável que você inclua os principais destaques do artigo no momento da submissão.

Os destaques são uma breve coleção de tópicos que devem capturar os resultados inéditos da sua pesquisa, bem como quaisquer novos métodos utilizados durante o estudo. Os destaques ajudarão a aumentar a visibilidade do seu artigo nos mecanismos de busca. Algumas diretrizes:

- Envie os destaques como um arquivo editável separado no sistema de submissão online, incluindo a palavra "destaques" no nome do arquivo.
- Os destaques devem consistir em 3 a 5 tópicos, cada um com no máximo 85 caracteres, incluindo espaços.

Recomendamos que você veja exemplos de destaques de artigos e leia sobre os benefícios de sua inclusão.

### **Fórmulas matemáticas**

- Envie as equações matemáticas como texto editável, não como imagens.
- Apresente as fórmulas simples em linha com o texto normal, sempre que possível.
- Use a barra (/) em vez de uma linha horizontal para termos fracionários pequenos, como  $X/Y$ .
- Variáveis apresentadas em itálico.
- Denotemos as potências de  $e$  por  $\exp$ .
- Apresente as equações separadamente do texto, numerando-as consecutivamente na ordem em que são mencionadas no texto.

### **Tabelas**

As tabelas devem ser enviadas como texto editável, não como imagens. Algumas diretrizes:

- Coloque as tabelas ao lado do texto relevante ou em uma ou mais páginas separadas no final do seu artigo.
- Cite todas as tabelas no texto do manuscrito.
- Numere as tabelas consecutivamente de acordo com a ordem em que aparecem no texto.
- Por favor, forneça legendas juntamente com as tabelas.
- Coloque as notas da tabela abaixo do corpo da tabela.
- Evite linhas verticais e sombreamento dentro das células da tabela.

Recomendamos que utilize tabelas com moderação, garantindo que os dados apresentados nelas não dupliquem resultados descritos em outras partes do artigo.

### **Figuras, imagens e obras de arte**

Figuras, imagens, ilustrações, diagramas e outros elementos gráficos devem ser fornecidos como arquivos separados juntamente com o manuscrito. Recomendamos a

leitura de nossas instruções detalhadas sobre ilustrações e outros elementos gráficos.  
Alguns trechos:

Ao enviar trabalhos artísticos:

- Cite todas as imagens no texto do manuscrito.
  - Numere as imagens de acordo com a sequência em que aparecem no seu artigo.
  - Envie cada imagem como um arquivo separado, utilizando uma convenção de nomenclatura lógica para seus arquivos (por exemplo, Figura\_1, Figura\_2 etc.).
- 
- Por favor, forneça legendas para todas as figuras, imagens e ilustrações.
  - Os gráficos podem ser incorporados ao texto na posição apropriada. Se estiver trabalhando com LaTeX, os gráficos também podem ser incorporados ao arquivo.

### **Formatos de obras de arte**

Quando sua arte estiver finalizada, "salve como" ou converta sua arte eletrônica para os formatos listados abaixo, levando em consideração os requisitos de resolução para desenhos de linha, meios-tons e combinações de linha/meio-tom:

- Desenhos vetoriais: Salve como arquivos EPS ou PDF incorporando a fonte ou salve o texto como "gráficos".
- Fotografias coloridas ou em tons de cinza (meios-tons): Salve como arquivos TIFF, JPG ou PNG com resolução mínima de 300 dpi (para coluna única: mín. 1063 pixels, largura da página inteira: 2244 pixels).
- Desenhos de linhas bitmap: Salve como arquivos TIFF, JPG ou PNG com uma resolução mínima de 1000 dpi (para coluna única: mín. 3543 pixels, largura da página inteira: 7480 pixels).
- Combinações de linhas bitmap/meios-tons (coloridas ou em tons de cinza): Salve como arquivos TIFF, JPG ou PNG com uma resolução mínima de 500 dpi (para coluna única: mín. 1772 pixels, largura da página inteira: 3740 pixels).

Por favor, não envie:

- Arquivos com resolução muito baixa (por exemplo, arquivos otimizados para uso em tela, como GIF, BMP, PICT ou WPG).
- Imagens desproporcionalmente grandes em relação ao tamanho da fonte podem tornar o texto ilegível.

## **Legendas das figuras**

Todas as imagens devem ter uma legenda. A legenda deve consistir em um título breve (não exibido na própria figura) e uma descrição da imagem. Recomendamos que você mantenha a quantidade de texto em qualquer imagem ao mínimo, embora quaisquer símbolos e abreviações utilizados devam ser explicados.

Forneça as legendas em um arquivo separado.

## **Arte colorida**

Se você enviar figuras coloridas utilizáveis com seu artigo aceito, garantiremos que elas apareçam coloridas online.

Certifique-se de que as imagens coloridas sejam acessíveis a todos, incluindo pessoas com daltonismo. Saiba mais sobre cores e acessibilidade na web.

## **Inteligência Artificial Generativa e Figuras, imagens e obras de arte**

Leia nossa política sobre o uso de IA generativa e ferramentas assistidas por IA em figuras, imagens e ilustrações, que pode ser encontrada nas Políticas de IA generativa para Periódicos da Elsevier . Esta política declara:

- Não permitimos o uso de IA generativa ou ferramentas assistidas por IA para criar ou alterar imagens em manuscritos submetidos.
- A única exceção ocorre quando o uso de IA ou ferramentas assistidas por IA faz parte do projeto ou dos métodos de pesquisa (por exemplo, na área de imagens biomédicas). Nesse caso, tal uso deve ser descrito de forma reproduzível na seção de métodos, incluindo o nome do modelo ou ferramenta, os números de versão e extensão e o fabricante.
- O uso de IA generativa ou ferramentas assistidas por IA na produção de obras de arte, como resumos gráficos, não é permitido. O uso de IA generativa na produção de capas de revistas pode ser permitido em alguns casos, desde que o autor obtenha autorização prévia do editor e da editora, demonstre que todos os direitos necessários para o uso do material em questão foram obtidos e assegure a correta atribuição do conteúdo.

## **Material suplementar**

Incentivamos o uso de materiais complementares, como aplicativos, imagens e trechos de áudio, para aprimorar a pesquisa. Algumas diretrizes:

- O material suplementar deve ser preciso e relevante para a pesquisa.

- Cite todos os arquivos suplementares no texto do manuscrito.
- Envie os materiais suplementares juntamente com o seu artigo. Esteja ciente de que todos os materiais suplementares fornecidos serão publicados online exatamente no mesmo formato de arquivo em que foram recebidos. Esses arquivos não serão formatados ou diagramados pela equipe de produção.
- Inclua uma legenda concisa e descritiva para cada arquivo suplementar, descrevendo seu conteúdo.
- Forneça os arquivos atualizados caso deseje fazer alterações nos materiais suplementares enviados em qualquer etapa do processo de publicação.
- Não faça anotações ou correções em uma versão anterior de um arquivo suplementar.
- Desative a opção de controle de alterações em arquivos do Microsoft Office. Se o controle de alterações estiver ativado, as alterações aparecerão na versão publicada.

## Vídeo

Esta revista aceita material em vídeo e sequências de animação para apoiar e aprimorar sua pesquisa científica. Incentivamos a inclusão de links para arquivos de vídeo ou animação em seus artigos. Algumas diretrizes:

- Ao incluir links para arquivos de vídeo ou animação em seu artigo, faça referência ao conteúdo do vídeo ou da animação adicionando uma nota no texto indicando onde o arquivo deve ser inserido.
- Identifique claramente os arquivos, garantindo que o nome do arquivo esteja diretamente relacionado ao seu conteúdo.
- Forneça os arquivos em um dos formatos recomendados. Os arquivos devem ter um tamanho máximo preferencial de 150 MB por arquivo e 1 GB no total.
- Forneça imagens estáticas para cada um dos seus arquivos. Elas serão usadas como ícones padrão para personalizar o link para seus vídeos. Você pode escolher qualquer quadro do seu vídeo ou animação, ou criar uma imagem separada.
- Inclua um texto descritivo em seu manuscrito para fazer referência ao conteúdo do vídeo. Esse texto ajuda a garantir a acessibilidade para leitores com deficiência visual que dependem de informações descritivas. Para periódicos com publicação impressa, isso também é essencial, pois arquivos de vídeo e animação não podem ser incorporados à versão impressa.

Publicamos todos os arquivos de vídeo e animação fornecidos na versão eletrônica do seu artigo.

Para obter instruções mais detalhadas, recomendamos que você leia nossas diretrizes sobre como enviar conteúdo de vídeo para inclusão no corpo de um artigo.

### **Dados de pesquisa**

Estamos empenhados em apoiar o armazenamento, o acesso e a descoberta de dados de pesquisa, e nossa política de dados de pesquisa estabelece os princípios que orientam a forma como trabalhamos com a comunidade científica para apoiar um processo de pesquisa mais eficiente e transparente.

Os dados de pesquisa referem-se aos resultados de observações ou experimentações que validam as descobertas da pesquisa, podendo também incluir software, código, modelos, algoritmos, protocolos, métodos e outros materiais úteis relacionados ao projeto.

Leia nossas diretrizes sobre compartilhamento de dados de pesquisa para obter mais informações sobre como depositar, compartilhar e usar dados de pesquisa e outros materiais de pesquisa relevantes.

### **Depósito, citação e vinculação de dados de pesquisa**

Para esta revista, aplicam-se as instruções da Opção B das nossas diretrizes de dados de pesquisa . Isso significa que você é incentivado a:

- Deposite os dados da sua pesquisa em um repositório de dados relevante.
- Cite e inclua um link para este conjunto de dados em seu artigo.
- Caso isso não seja possível, apresente uma declaração explicando por que os dados da pesquisa não podem ser compartilhados.

### **Declaração de dados**

Para promover a transparência, recomenda-se que você informe a disponibilidade de quaisquer dados no momento do envio.

Garantir a disponibilidade dos dados pode ser uma exigência da sua agência de financiamento ou instituição. Caso seus dados não estejam disponíveis ou não sejam adequados para publicação, você pode indicar o motivo (por exemplo, seus dados de pesquisa incluem informações sensíveis ou confidenciais, como dados de pacientes) durante o processo de submissão. Essa declaração aparecerá junto com seu artigo publicado no ScienceDirect.

Leia mais sobre a importância e os benefícios de fornecer uma declaração de dados.

## **Vinculação de dados**

Ao incluir links para os dados que fundamentam seu trabalho, você aumenta sua visibilidade e pode levar a novas colaborações. Isso também proporciona aos leitores uma melhor compreensão da pesquisa descrita.

Se os seus dados de pesquisa foram disponibilizados em um repositório de dados, existem várias maneiras de vincular diretamente o seu artigo ao conjunto de dados:

- Forneça um link para seu conjunto de dados quando solicitado durante o processo de submissão online.
- Para alguns repositórios de dados, um banner do repositório aparecerá automaticamente ao lado do seu artigo publicado no ScienceDirect.
- Você também pode incluir links para dados ou entidades relevantes no texto do seu artigo por meio de identificadores. Utilize o seguinte formato: Banco de dados: 12345 (ex.: TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Saiba mais sobre como vincular dados de pesquisa e artigos científicos no ScienceDirect.

## **Elementos de pesquisa**

Esta revista permite a publicação de objetos de pesquisa (por exemplo, dados, métodos, protocolos, software e hardware) relacionados a pesquisas originais nas revistas Research Elements da Elsevier .

A Research Elements é uma série de periódicos de acesso aberto com revisão por pares que tornam os objetos de pesquisa localizáveis, acessíveis e reutilizáveis. Ao fornecer descrições detalhadas dos objetos e suas aplicações, com links para o artigo de pesquisa original, seus objetos de pesquisa podem ser contextualizados dentro do seu artigo.

Durante o processo de submissão, você será notificado sobre a oportunidade de submeter um manuscrito a um dos periódicos da Research Elements. Seu artigo para a Research Elements pode ser preparado por você ou por um de seus colaboradores.

## **Submissão conjunta de dados, métodos ou protocolos relacionados.**

Você é incentivado(a) a publicar uma descrição dos seus dados de pesquisa, métodos ou protocolos relacionados ao seu artigo principal como um artigo de submissão conjunta no Data in Brief ou MethodsX .

Esta submissão conjunta pode ser submetida ao mesmo tempo que a sua submissão regular do manuscrito para esta revista. Se ambos os manuscritos, o regular e o conjunto, forem aceitos para publicação, eles serão vinculados no ScienceDirect,

promovendo assim a reprodutibilidade da pesquisa, a interoperabilidade e a ciência aberta.

- Prepare um manuscrito separado descrevendo seus dados de pesquisa, métodos ou protocolos, utilizando os modelos obrigatórios do Data in Brief ou do MethodsX .
- Envie esta submissão conjunta juntamente com seu manuscrito principal como um item de submissão separado, na página "Anexar arquivos" do Editorial Manager. Em seguida, ela será encaminhada automaticamente para o Data in Brief ou MethodsX e atribuída a um editor.

Para obter detalhes sobre a Taxa de Processamento de Artigos (APC) associada, visite: MétodosX; Dados em resumo

Atenção: Devido ao processo automatizado de submissão ao Data in Brief ou MethodsX , somente após a aceitação você receberá uma taxa de publicação de artigo em acesso aberto personalizada, com base no seu contexto individual (seu país, afiliação institucional e participação em sociedades, por exemplo).

Por favor, visite a página de Suporte ao Pesquisador para Submissão Conjunta para obter mais informações sobre como submeter um artigo em conjunto.

## **Informações específicas para o periódico: Redação e formatação**

Por favor, adicione números de linha e de página contínuos em seu documento principal.

## **Estrutura do artigo**

### **Seções do artigo**

- Divida seu artigo em seções claramente definidas e numeradas. Numere as subseções como 1.1 (depois 1.1.1, 1.1.2, ...), depois 1.2, etc.
- Utilize a numeração correta ao fazer referências cruzadas dentro do seu artigo. Não se refira apenas ao "texto".
- Você pode dar um título breve às subseções. Os títulos devem aparecer em uma linha separada.
- Não inclua o resumo do artigo na numeração das seções.

## **Glossário**

Por favor, forneça as definições dos termos específicos da área utilizados em seu artigo, em uma lista separada.

## **Notas de rodapé**

Recomendamos que utilize notas de rodapé com moderação. Caso as inclua no seu artigo, certifique-se de que estejam numeradas consecutivamente.

Você pode usar recursos do sistema que inserem automaticamente notas de rodapé no texto. Como alternativa, você pode indicar a posição das notas de rodapé no texto e apresentá-las em uma seção separada no final do seu artigo.

## **Agradecimentos**

Inclua na seção de agradecimentos todas as pessoas que lhe prestaram auxílio durante a pesquisa, como ajuda com o idioma, a redação ou a revisão.

Os agradecimentos devem ser colocados em uma seção separada, que aparece imediatamente antes da lista de referências. Não inclua agradecimentos na página de título, como nota de rodapé do título ou em qualquer outro lugar do artigo, exceto na seção de agradecimentos.

## **Contribuições dos autores: CRediT**

Os autores correspondentes devem reconhecer as contribuições dos coautores usando as funções do CRediT (Contributor Roles Taxonomy) :

- Conceitualização
- Curadoria de dados
- Análise formal
- Obtenção de financiamento
- Investigação
- Metodologia
- Administração de projetos
- Recursos
- Software
- Supervisão
- Validação
- Visualização
- Redação – rascunho original

- Escrita – revisão e edição

Nem todas as funções do CRediT se aplicarão a todos os manuscritos e alguns autores poderão contribuir por meio de múltiplas funções.

Recomendamos que você leia mais sobre o CRediT e veja um exemplo de declaração de autoria do CRediT .

## **Fontes de financiamento**

Os autores devem divulgar quaisquer fontes de financiamento que tenham fornecido apoio financeiro para a realização da pesquisa e/ou preparação do artigo. O papel dos patrocinadores, se houver, deve ser declarado em relação ao desenho do estudo, coleta, análise e interpretação dos dados, redação do relatório e decisão de submeter o artigo para publicação. Caso as fontes de financiamento não tenham tido tal envolvimento, isso deve ser declarado na submissão.

Liste as fontes de financiamento desta forma padronizada para facilitar o cumprimento dos requisitos do financiador:

Financiamento: Este trabalho foi financiado pelos Institutos Nacionais de Saúde [números de concessão xxxx, yyyy]; pela Fundação Bill & Melinda Gates, Seattle, WA [número de concessão zzzz]; e pelos Institutos da Paz dos Estados Unidos [número de concessão aaaa].

Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou o tipo de bolsas, auxílios e prêmios. Quando o financiamento provém de uma verba global ou de outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra instituição de pesquisa, indique o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento.

Caso não tenha sido disponibilizado financiamento para a pesquisa, recomenda-se incluir a seguinte frase:

Esta pesquisa não recebeu financiamento específico de agências de fomento dos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

## **Apêndices**

Solicitamos que utilize o seguinte formato para os anexos:

Identifique os apêndices individuais em seu artigo usando o formato: A, B, etc.

Numere as fórmulas e equações separadamente dentro dos apêndices, usando formatos como Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc., e nos apêndices subsequentes, Eq. (B.1), Eq. (B.2), etc.

Da mesma forma, numere as tabelas e figuras separadamente, usando formatos como Tabela A.1; Fig. A.1, etc.

## Referências

### Referências dentro do texto

Todas as referências citadas no seu artigo devem constar também na sua lista de referências, e vice-versa. Algumas diretrizes:

- As referências citadas no seu resumo devem ser apresentadas na íntegra.
- Recomendamos que você não inclua resultados não publicados e comunicações pessoais em sua lista de referências, embora possa mencioná-los no texto do seu artigo.
- Quaisquer resultados não publicados e comunicações pessoais incluídos na sua lista de referências devem seguir o estilo de referência padrão da revista. Em vez da data de publicação, adicione "resultados não publicados" ou "comunicação pessoal".
- As referências citadas como "no prelo" implicam que o item foi aceito para publicação.

Incluir links para as fontes citadas aumentará a visibilidade da sua pesquisa.

Antes de submeter o artigo, verifique se todos os dados fornecidos na sua lista de referências estão corretos, incluindo quaisquer referências que tenham sido copiadas. Fornecer dados de referência corretos permite-nos criar links para serviços de indexação e resumos como o Scopus, Crossref e PubMed. Quaisquer sobrenomes, títulos de periódicos ou livros, anos de publicação ou paginação incorretos nas suas referências podem impedir a criação de links.

Recomendamos o uso de Identificadores de Objetos Digitais (DOIs) como links de referência, pois eles fornecem um link permanente para o artigo eletrônico referenciado.

### Estilo de referência

Indique as referências por número(s) entre colchetes na mesma linha do texto. Você pode mencionar os nomes dos autores no texto, mas deve sempre fornecer o número da referência, por exemplo, "como demonstrado [3,6]. Barnaby e Jones [8] obtiveram um resultado diferente ....".

Numere as referências na lista de referências na ordem em que aparecem no texto.

Observe a forma abreviada para o número da última página, por exemplo, 51-9, e que, para mais de 6 autores, os 6 primeiros devem ser listados seguidos de 'et al.'.

Para obter mais detalhes, consulte 'Requisitos Uniformes para Manuscritos submetidos a Revistas Biomédicas' (J Am Med Assoc 1997;277:927-34) e mais exemplos de referências formatadas .

Abreviar os nomes dos periódicos de acordo com a Lista de Abreviaturas de Palavras de Títulos (LTWA).

Exemplos:

#### **Referência a uma publicação em periódico:**

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. A arte de escrever um artigo científico. 163:51-9. <https://doi.org/10.1016/j.sc.2020.00372>.

#### **Referência a uma publicação em periódico com número de artigo:**

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. A arte de escrever um artigo científico. Heliyon. 2022;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e00205>.

#### **Referência a um livro:**

[3] Strunk Jr W, White EB. Os elementos do estilo. 4ª ed. Nova York: Longman; 2000.

#### **Referência a um capítulo de um livro:**

[4] Mettam GR, Adams LB. Como preparar uma versão eletrônica do seu artigo. Em: Jones BS, Smith RZ, editores. Introdução à era eletrônica, Nova York: E-Publishing Inc; 2023, p. 281-304.

#### **Referência a um site:**

[5] Cancer Research UK. Relatórios de estatísticas de câncer para o Reino Unido, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2023 [acessado em 13 de março de 2023].

#### **Referência a um conjunto de dados:**

[6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Dados de mortalidade para a doença do murchamento do carvalho japonês e composições florestais circundantes [conjunto de dados]. Mendeley Data. 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

#### **Referência ao software:**

[7] Coon E, Berndt M, Jan A, Svyatsky D, Atchley A, Kikinzon E, et al. Simulador Terrestre Avançado (ATS). Versão 0.88 [software]. Zenódo; 25 de março de 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

## **Estilo de referência**

### **Referências da Web**

Ao listar referências da web, você deve fornecer, no mínimo, o URL completo e a data do último acesso. Informações adicionais (como DOI, nomes dos autores, datas ou referência à publicação original) também devem ser fornecidas, se disponíveis.

Você pode listar as referências da web separadamente sob um novo título, logo após a sua lista de referências, ou incluí-las na própria lista de referências.

### **Referências de dados**

Recomendamos que você cite os conjuntos de dados subjacentes ou relevantes no texto do artigo e que liste as referências dos dados na lista de referências.

Ao citar referências de dados, você deve incluir:

- nome(s) do(s) autor(es)
- título do conjunto de dados
- repositório de dados
- versão (quando disponível)
- ano
- identificador persistente global

Adicione [dataset] imediatamente antes da sua referência. Isso nos ajudará a identificar corretamente o conjunto de dados. O identificador [dataset] não aparecerá no seu artigo publicado.

### **Referências de pré-impressão**

Solicitamos que identifique claramente os preprints. Inclua a palavra "preprint" ou o nome do servidor de preprints como parte da sua referência e forneça o DOI do preprint.

Caso um preprint tenha sido posteriormente disponibilizado como uma publicação revisada por pares, utilize a publicação formal como sua referência.

Se houver pré-publicações que sejam fundamentais para o seu trabalho ou que abordem desenvolvimentos cruciais no tema, mas que ainda não tenham sido publicadas formalmente, você pode citá-las.

### **Software de gerenciamento de referências**

A maioria das revistas da Elsevier disponibiliza seu modelo de referências em softwares populares de gerenciamento de referências. Isso inclui produtos que suportam a Linguagem de Estilo de Citação (CSL), como o Mendeley Reference Manager .

Se você utiliza um plugin de citação desses produtos, selecione o modelo de periódico relevante e todas as suas citações e bibliografias serão formatadas automaticamente no estilo do periódico. Recomendamos que você remova todos os códigos de campo antes de submeter seu manuscrito a qualquer software de gerenciamento de referências.

Caso não haja um modelo disponível para esta revista, siga o formato apresentado nos exemplos da seção de estilo de referência deste Guia para Autores.

## **Submissão do seu manuscrito**

### **Lista de verificação para submissão**

Antes de concluir o envio do seu manuscrito, recomendamos que leia nossa lista de verificação para submissão:

- Um dos autores foi designado como autor correspondente e seus dados de contato completos (endereço de e-mail, endereço postal completo e números de telefone) foram fornecidos.
- Todos os arquivos foram carregados, incluindo palavras-chave, legendas das figuras e tabelas (com título, descrição e notas de rodapé). Isso inclui quaisquer materiais suplementares e vídeos.
- Foram realizadas verificações ortográficas e gramaticais.
- Todas as referências presentes no texto do artigo são citadas na lista de referências e vice-versa.
- Foi obtida autorização para a utilização de qualquer material protegido por direitos autorais proveniente de outras fontes, incluindo a Web.
- Para artigos de acesso aberto, todos os autores compreendem que são responsáveis pelo pagamento da taxa de publicação do artigo (APC, na sigla em inglês) caso o manuscrito seja aceito. O pagamento da APC pode ser coberto pela instituição do autor correspondente ou pela agência de fomento à pesquisa.

## **Envie online**

Nosso sistema de submissão online orienta você em todas as etapas do processo, desde o preenchimento dos detalhes do seu manuscrito até o envio dos seus arquivos. O sistema converte os arquivos do seu artigo em um único arquivo PDF, utilizado no processo de revisão por pares.

- 1004 Para formatar seu artigo para publicação final, são necessários arquivos editáveis (por  
1005 exemplo, Word, LaTeX). Toda a correspondência, incluindo a notificação da decisão  
1006 do editor e solicitações de revisão, será enviada por e-mail.
- 1007 Por favor, siga este link para submeter seu artigo.