

36

Circular
TécnicaCampo Grande, MS
Dezembro, 2009

Autores

Lucimara ChiariBióloga, D.Sc. em Genética e
Melhoramento, pesquisadora da
Embrapa Gado de Corte, Campo
Grande, MS, lchiari@cnpgc.embrapa.br**João Victor Rodrigues do Valle**Biólogo, Bolsista PIBIC/CNPq,
Embrapa Gado de Corte, Campo
Grande, MS, jovalle21@yahoo.com.br**Rosângela Maria Simeão Resende**Bióloga, D.Sc. em Genética,
pesquisadora da Embrapa Gado
de Corte, Campo Grande, MS,
rosangela@cnpgc.embrapa.br

Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*

Introdução

A extração de DNA puro, de boa qualidade, é pré-requisito para qualquer análise molecular. Existem várias metodologias disponíveis para o isolamento de DNA genômico de plantas, mas, na prática, esses procedimentos são empíricos em função da variabilidade existente na composição do tecido vegetal utilizado. Os métodos convencionais simples de extração de DNA não são necessariamente reprodutíveis para todas as espécies, sendo necessárias adaptações e modificações (ARAS et al., 2003).

A diferença básica entre os protocolos de extração de DNA de plantas está na composição do tampão de extração que, normalmente integra um agente tampante para estabilizar o pH em torno de 8; um sal para dissociar as proteínas do DNA; um detergente para solubilizar as membranas e auxiliar na inativação de algumas enzimas; e um inibidor de DNases para proteger o DNA (BERED, 1998). Dellaporta et al. (1983) usaram dodecil sulfato de sódio (SDS) como detergente, enquanto Doyle, J. e Doyle, L. (1987) usaram o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e Cheung et al. (1993), o sarcosyl.

Em *Stylosanthes guianensis*, os problemas mais frequentemente ligados à extração de DNA de qualidade é a contaminação do DNA isolado por fenóis e polissacarídeos. Essa espécie apresenta elevados níveis de polissacarídeos em suas folhas, mesmo jovens. Os polissacarídeos são inibidores potenciais da enzima de restrição *Hind* III (DO; ADAMS, 1991) e podem inibir a atividade da *Taq* DNA polimerase (DEMEKE; ADAMS, 1992; FANG et al., 1992; PANDEY et al., 1996). Essas contaminações, geralmente, alteram os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR) e, portanto, levam a interpretações erradas.

De modo geral, a extração de DNA de *Stylosanthes* spp. é executada utilizando folhas jovens, frescas ou congeladas em nitrogênio líquido no momento da coleta e mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o momento da extração, e protocolos baseados no uso de CTAB. Bonato et al. (2002) propuseram um método de extração para espécies de *Stylosanthes*, utilizando amostras de *S. capitata*, com base no protocolo descrito por Saghai-Marrof et al. (1984) para cevada. A principal modificação proposta foi a adição de fenol:clorofórmio (1:1 v/v) no processo de desproteínização para eliminação de proteínas. Faleiro et al. (2003) basearam-se no protocolo de Doyle, J. e Doyle, L. (1987), mas usaram maior concentração de CTAB no tampão de extração testado em espécies dos Cerrados, incluindo *Stylosanthes guianensis* e *S. macrocephala*, visando a diminuir a quantidade de polissacarídeos no DNA extraído.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi comparar a quantidade e qualidade do DNA isolado de folhas de *S. guianensis* pelos métodos de Bonato et al. (2002), de Faleiro et al. (2003) e um método baseado no de Bonato et al. (2002), mas com modificações que resultem um DNA mais puro e em quantidade suficiente para execução de diversas análises moleculares, incluindo amplificação, clonagem e sequenciamento.

Metodologia

Foram coletadas folhas jovens de três acessos de *S. guianensis*, pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, instalados em casa de vegetação por meio de estaquia. A amostragem das folhas dos diferentes genótipos foi realizada inviavelmente no mesmo estágio de desenvolvimento. As folhas coletadas foram acondicionadas em gelo para serem transportadas até o laboratório, onde foram pesadas em balança semianalítica e cerca de 300 mg foram utilizados para a extração de DNA. Foram realizadas três repetições de extração de cada genótipo para cada um dos protocolos descritos a seguir.

Protocolo 1

Método de Bonato et al. (2002) – Cerca de 300 mg de tecido foliar fresco foram pulverizados em cadinhos de porcelana com nitrogênio líquido e, após, o pó bem fino obtido foi transferido para tubos de microcentrifuga de 2 mL. Foram adicionados ao material 900 μ L de tampão de extração pré-aquecido a 65°C (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2% 2- β -mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8; 1% PVP 40). Incubaram-se as amostras a 65°C por 60 minutos, invertendo os tubos, suavemente, a cada 10 minutos. Após deixar esfriar à temperatura ambiente por 5 minutos, as amostras foram centrifugadas a 4.500 g por 10 minutos. Para a desproteção, adicionaram-se às amostras 500 μ L de fenol-clorofórmio (1:1 v/v). Os tubos foram invertidos, cuidadosamente, por 10 minutos e, depois, centrifugados a 4.500 g para separação das fases. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos tubos de 2 mL e repetiu-se esse procedimento. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi novamente transferido e, desta vez, foram adicionados 450 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Os tubos foram invertidos, cuidadosamente, por 10 minutos e centrifugados a 4.500 g por 10 minutos. Para a precipitação do DNA, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 1,5 mL e foram adicionados 600 μ L de isopropanol gelado (mantido a -20°C). Os tubos foram mantidos a -20°C por 30 minutos e, a seguir, centrifugados a 10.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) e seco em temperatura ambiente, por aproximadamente 60 minutos. Os ácidos nucleicos totais foram ressus-

pendidos em 400 μ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA). O DNA foi novamente precipitado adicionando-se 20 μ L de NaCl 5M e 800 μ L de etanol absoluto gelado (mantido em -20°C). As amostras foram invertidas, cuidadosamente, e centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado e seco como anteriormente. O sedimento foi ressuspendido em 100 μ L de TE contendo 6 μ L de RNase (10 mg/mL) e colocados em banho-maria a 37°C por 30 minutos para a completa ressuspensão do DNA e digestão do RNA contaminante. O DNA isolado foi então armazenado a -20°C.

Protocolo 2

Método de Faleiro et al. (2003) – Cerca de 300 mg de tecido foliar fresco foram pulverizados em cadinhos de porcelana com nitrogênio líquido e transferidos para tubos de microcentrifuga de 2 mL. Foram adicionados ao material 800 μ L de tampão de extração (2,8% CTAB; 1,3 M NaCl; 0,2% 2- β -mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8; 1% PVP 40). Incubou-se a 70°C por 60 minutos, invertendo os tubos, suavemente, a cada 10 minutos. Após deixar esfriar à temperatura ambiente por 5 minutos, foi realizada a desproteção, adicionando-se 700 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas, por suaves inversões, por 10 minutos e centrifugadas a 4°C, a 18.845 g, por 10 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubos de 2 mL, foram adicionados 55 μ L de CTAB 7% e o processo de desproteção foi repetido, acrescentando-se o mesmo volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Para a precipitação do DNA, foram adicionados ao sobrenadante 700 μ L de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20°C por duas horas e, a seguir, centrifugados como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) e seco em temperatura ambiente, por aproximadamente 60 minutos. Posteriormente, os ácidos nucleicos totais foram ressuspendidos em 150 μ L de água contendo RNase na concentração de 40 μ g/mL e colocados em banho-maria a 37°C por 60 minutos para a completa ressuspensão do DNA e digestão do RNA. Após esse período, o DNA foi novamente precipitado, centrifugado e ressuspendido em 150 μ L de água, como já descrito. A conservação do DNA extraído foi feita a -20°C.

Protocolo 3

Método de Bonato et al. (2002) modificado pela adição de acetato de amônia – Cerca de 300 mg de tecido foliar fresco foram pulverizados em cadinhos de porcelana com nitrogênio líquido e, após, o pó bem fino obtido foi transferido para tubos de microcentrífuga de 2 mL. Foram adicionados ao material 900 µL de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2% 2-β-mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8; 1% PVP 40), à temperatura ambiente. Incubou-se a 65°C por 60 minutos, invertendo os tubos, suavemente, a cada 10 minutos. Após deixar esfriar a temperatura ambiente por 5 minutos, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos. Para a desproteção, adicionaram-se às amostras 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1 v/v). Os tubos foram invertidos, cuidadosamente, por 10 minutos e, depois, centrifugados a 10.000 g para separação das fases. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos tubos de 2 mL e repetiu-se esse procedimento. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi novamente transferido e, desta vez, foram adicionados 450 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Os tubos foram invertidos, cuidadosamente, por 10 minutos e centrifugados a 10.000 g por 10 minutos. Ao final dessa etapa, as fases superiores foram transferidas para tubos de 1,5 mL e foram adicionados 200 µL de acetato de amônia 7,5 M e, em seguida, 800 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20°C por 60 minutos e centrifugados a 10.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% (v/v) e seco em temperatura ambiente, por aproximadamente 60 minutos. Os ácidos nucleicos totais foram ressuspensos em 400 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA). O DNA foi novamente precipitado adicionando-se 20 µL de NaCl 5 M, 40 µL de acetato de amônia 7,5 M e 800 µL de etanol absoluto. As amostras foram invertidas, cuidadosamente, mantidas a -20°C por 60 minutos e centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado e seco como descrito anteriormente. O sedimento foi ressuspensado em 100 µL de TE contendo 6 µL de RNase (10 mg/mL) e colocados em banho-maria a 37°C por 30 minutos para a completa ressuspensão do DNA e digestão do RNA. O DNA foi armazenado a -20°C.

Após extração, os DNAs foram quantificados em espectrofotômetro a uma absorbância de 260 nm e a relação de absorbância A260/A280 foi determinada para verificar a contaminação por proteínas. Análises de variância foram realizadas segundo um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

Os DNAs extraídos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (100 V), corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), para verificar a integridade e qualidade das bandas, utilizando critérios descritos por Romano e Brasileiro (1999).

Testou-se, também, a capacidade de restrição da enzima *Hind* III para os DNAs extraídos. Cerca de 1 µg de DNA isolado foi digerido utilizando 1 U de enzima por 60 minutos a 37°C, conforme as recomendações do fabricante da enzima (Invitrogen). Como controle positivo foi utilizado o DNA do fago lambda.

Por fim, foram realizados testes de amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR) dos DNAs extraídos utilizando dois *primers* randômicos, J16 (CTG CTT AGG G) e L7 (AGG CGG GAA C), sintetizados pela Invitrogen. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo: 0,4 mM de *primer*; 0,2 mM de cada dNTP; 2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 1X tampão da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen); e 20 ng de DNA. Foi utilizado o termociclador PTC-100 (MJ Research) programado para uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 40°C por 1,5 minuto e 72°C por 2 minutos, e, por fim, uma etapa de 72°C por 7 minutos. Foram feitas três repetições de cada reação com todas as amostras (incluindo repetições de extração) para ambos os *primers*.

Após amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, previamente corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Foram adicionados a cada amostra 3 µL de tampão de corrida 6 X (0,25 g de azul de bromofenol, 15 g de ficoll 400 em 100 mL de água milliQ autoclavada). O tampão utilizado para o preparo do gel e na eletroforese foi o TBE 1 X (0,89 M Tris; 0,89 M borato e 0,08 M EDTA).

Após eletroforese, que foi realizada a 100 V por aproximadamente três horas, os géis foram visualizados em luz UV e fotodocumentados em sistema digital L.Pix Image (Loccus Biotecnologia).

Resultados e Discussão

A concentração média de DNA extraído das folhas dos três acessos de *S. guianensis* pelos três protocolos utilizados está apresentada na Tabela 1, assim como as relações de absorvância A260/A280.

Considerando-se os valores médios obtidos das leituras à A206, das três extrações de cada genótipo, foram observadas diferenças significativas entre os

protocolos para os três genótipos pelo teste Tukey a 1% de probabilidade. Observa-se que maiores concentrações de DNA foram obtidas quando utilizou o método de Bonato et al. (2002) sem e com modificações, protocolos 1 e 3, respectivamente.

Com relação às razões A260/A208 obtidas, os três métodos produziram DNAs contaminados por proteínas. Diferenças significativas entre os genótipos foram observadas, mas não se relacionam aos protocolos para os três genótipos. Razões entre 1,8 e 2 indicam um DNA puro, enquanto razões menores indicam contaminação por proteínas e maiores indicam contaminação por fenóis (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Tabela 1. Quantificação e análise da pureza dos DNAs extraídos pelos protocolos 1 (BONATO et al. 2002), 2 (FALEIRO et al., 2003) e 3 (BONATO et al. 2002, modificado), a partir de amostras de tecido foliar provenientes de três acessos de *Stylosanthes guianensis*, utilizando leituras de absorvância a 260 e 280 nm. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Acessos	A260/A280			Total DNA (μg) ⁽¹⁾		
	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
A	1,498a	1,529a	1,503a	37,62a	13,30c	37,52a
B	1,359b	1,462a	1,458b	38,35a	15,84c	35,75a
C	1,502a	1,409b	1,500a	30,62b	15,09c	34,87a

Segundo Bonato et al. (2002), a inclusão da etapa clorofórmio:fenol no processo de extração foi fundamental para a obtenção de DNA de qualidade em *Stylosanthes*. Contudo, no caso de *S. guianensis*, observou-se que foi possível a extração de DNA de igual pureza (relação A206/A208) a partir de um método que não utiliza fenol (método de Faleiro et al., 2003), que é um reagente altamente tóxico.

A análise da integridade e qualidade dos DNAs extraídos, verificada pela eletroforese em gel de agarose 0,8%, está apresentada na Figura 1. Foram obtidas amostras íntegras de DNA pelos três métodos para os três acessos avaliados, pois não se observou arraste vertical dos DNAs no gel. A integridade do DNA é fundamental para a clareza e reprodutibilidade dos produtos de amplificação pela PCR (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). Também foi verificada baixa concentração de polissacarídeos nas amostras, independente do método utilizado na extração, pois as bandas não apresentaram forma cônica em direção ao polo positivo ou muito DNA retido no poço do gel. Além disso, verificou-se que

todas as amostras estavam livres de RNA, pois não foram observadas bandas com menor massa molecular no gel.

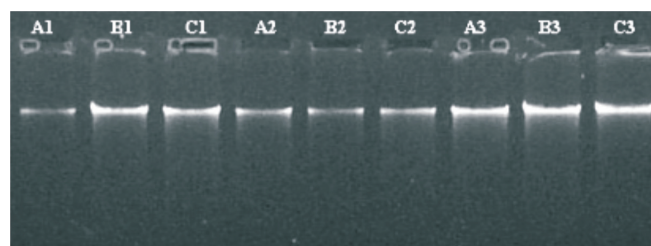


Figura 1. DNAs genômicos extraídos de *Stylosanthes guianensis*, acessos A, B e C, utilizando os protocolos 1 (BONATO et al., 2002), 2 (FALEIRO et al., 2003) e 3 (BONATO et al. 2002, modificado), respectivamente.

As digestões dos DNAs isolados com a endonuclease de restrição *Hind* III (Figura 2) também sugeriram baixa contaminação por polissacarídeos nos DNAs extraídos pelos três métodos, indicando que esses métodos de extração podem ser convenientemente usados para obtenção de DNA de *Stylosanthes* ssp., visando à clonagem para subsequente sequenciamento.

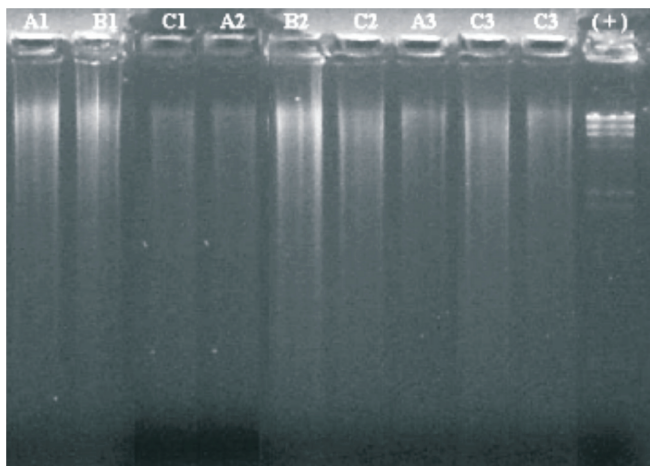


Figura 2. Perfil da digestão com a endonuclease *Hind* III do DNA genômico extraído dos acessos A, B e C de *Stylosanthes guianensis* pelos protocolos 1 (BONATO et al., 2002), 2 (FALEIRO et al., 2003) e 3 (BONATO et al., 2002, modificado). O controle positivo (+) foi o DNA do fago lambda digerido com a endonuclease *Hind* III nas mesmas condições.

De modo geral, os DNAs extraídos também apresentaram boa qualidade para serem utilizados nas reações de PCR com *primers* randômicos (RAPD), com exceção do protocolo 1 (BONATO et al., 2002), pois nos vários testes de amplificação usando os DNAs isolados dos acessos A e C, ora eles amplificam ora não, com ambos os *primers*. A Figura 3 exemplifica um dos géis obtidos com a amplificação dos DNAs extraídos com os *primers* J16 e L07. Observa-se na Figura 3 que o DNA dos acessos A e C extraídos com o protocolo 1 não amplificaram com os *primers* J16 e L07, respectivamente. Embora essas amostras tenham sido digeridas usando *Hind* III, a presença de polissacarídeos, mesmo que pequena, pode ter sido a causa de problemas na amplificação, pois, segundo Demeke e Adams (1992), Fang et al. (1992) e Pandey et al. (1996), esse tipo de contaminação pode inibir a atividade da *Taq* DNA polimerase, interferindo nas amplificações via PCR.

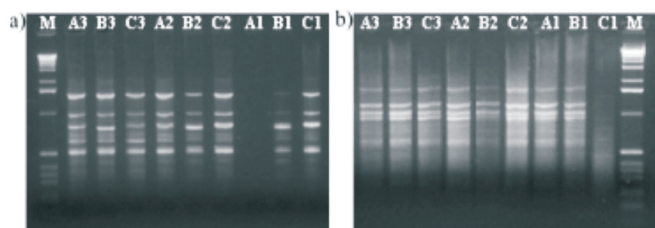


Figura 3. Perfis de RAPD gerados com os *primers*: a) J16 e b) L07. Nos quais, M corresponde ao marcador de peso molecular 1Kb *plus* DNA ladder (Invitrogen); A, B e C, correspondem aos acessos de *Stylosanthes guianensis*; e 1, 2 e 3, aos protocolos de extração utilizados: 1 (BONATO et al., 2002), 2 (FALEIRO et al., 2003) e 3 (BONATO et al., 2002, modificado).

Os resultados demonstram que os protocolos 2 (FALEIRO et al., 2003) e 3 (BONATO et al., 2002, modificado) foram mais eficientes na extração de DNA de folhas de *S. guianensis*, principalmente por causa da resolução apresentada nos perfis de RAPD produzidos com os dois *primers* utilizados. Considerando-se a concentração de DNA isolado, o protocolo 3 foi mais eficiente, pois extraiu maior quantidade de DNA.

Referências

ARAS, S.; DURAN A.; YENILMEZ, G. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis* L. specimens. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, p. 461a-461f, Dec. 2003.

BERED, F. Extração de DNA – considerações e prática. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach, 1998. 141 p.

BONATO, A. L. V.; VERZIGNASSI, J. R.; RESENDE, R. M. S.; FERNANDES, C. D.; LEGUIZAMON, G. O. de C. **Extração de DNA genômico de *Stylosanthes* spp.** Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 78).

CHEUNG, W. Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B. S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Technical Tips**, v. 3, p. 69-70, 1993.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Report**, v. 1, n. 4, p. 19-20, Sept. 1983.

DEMEKE, T.; ADAMS, R. P. The effect of plant polysaccharides and buffer additives of PCR. **BioTechniques**, v. 12, p. 332-334, 1992.

DO, N.; ADAMS, R. P. A simple technique for removing the plant polysaccharide contaminants from DNA. **BioTechniques**, v. 10, n. 2, p. 162-166, Feb. 1991.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARRIA, C. T. Operacionalização da extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando análises moleculares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Melhoramento e qualidade de vida: anais**. Porto Seguro: SBMP, 2003. 1 CD-ROM.

FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **Biotechniques**, v. 13, n. 1, p. 52-54, Jul. 1992.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20).

PANDEY, R. N.; ADAMS, R. P.; FLOURNOY, L. E. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 14, n. 1, p. 17-22, Mar. 1996.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. **Biologia Ciência e Desenvolvimento**, ano 2, n. 9, p. 40-43, 1999. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/bio_9.pdf>. Acesso em: 20 de março de 2009.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SLOMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, Dec. 1984.

CGPE 8291

Circular Técnica, 36

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Corte
Endereço: Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal
154, 79002-970 Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368-2083
Fax: (67) 3368-2083
E-mail: publicacoes@cnpgc.embrapa.br

1ª edição
Versão online (2009)

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



Comitê de publicações

Presidente: Cleber Oliveira Soares
Secretário-Executivo: Grácia Maria S. Rosinha
Membros: Fabiane Siqueira, Ecila Carolina N. Z. Lima, Elane de Souza Salles, Grácia Maria S. Rosinha, Jaqueline Rosemeire Verzignassi, Lucimara Chiari, Paulo Henrique Nogueira Biscola, Roberto Giolo de Almeida, Rodrigo Amorim Barbosa

Expediente

Supervisão editorial: Ecila Carolina N. Zampieri Lima
Revisão de texto: Lúcia Helena Paula do Canto
Editoração eletrônica: Ecila Carolina N. Zampieri Lima