

Comunicado Técnico 119

ISSN 1983-9731
Campo Grande, MS
Dezembro, 2009

Produção e Caracterização de MPB70 de *Mycobacterium bovis* para Uso em Imunodiagnóstico

Thaís de Andrade Farias¹

Flávio Ribeiro de Araújo²

Ana Luíza Alves Rosa Osório³

Kláudia dos Santos Gonçalves Jorge⁴

Alexandre Azambuja⁵

Grácia Maria Soares Rosinha⁶

Cleber Oliveira Soares⁷

Introdução

A tuberculose bovina é uma importante enfermidade infecciosa, causada pela bactéria *Mycobacterium bovis* (O'REILLY; DABORN, 1995). Esta enfermidade é responsável por consideráveis perdas econômicas, além de constituir problema de saúde pública (AMADORI et al., 2002). No Brasil, o controle da tuberculose bovina é baseado na identificação e eliminação dos animais infectados (JORGE et al., 2004a), tomando como base a reação intradérmica a derivados protéicos purificados (PPD) (MONAGHAN et al., 1994).

Este teste pode apresentar problemas de especificidade, devido a reações cruzadas com micobactérias atípicas, o que caracteriza uma dificuldade relevante para os programas de erradicação (FRANCIS et al., 1978; NEILL; POLLOCK, 2000; WOOD; JONES, 2001). Além disso, os animais testados só podem

ser novamente submetidos à tuberculinização após pelo menos 60 dias (AAGAARD et al., 2006). Outra limitação da reação intradérmica são as reações falso-negativas em animais anérgicos, em estágios avançados da doença (JORGE et al., 2004b), os quais, por não serem detectados pela tuberculinização, permanecem como fontes de infecção no rebanho. Dessa forma, métodos de imunodiagnóstico alternativos são necessários para melhorar a identificação de animais infectados por *M. bovis*.

Assim como em outras espécies de micobactérias, a resposta imune predominantemente detectada é a celular, seguida posteriormente pela produção de anticorpos específicos. Dessa forma, os testes sorológicos podem complementar o diagnóstico da tuberculose bovina (PLACKETT et al., 1989). Além disso, os testes sorológicos podem elucidar situações epidemiológicas da doença em rebanhos, caracterizados por resultados duvidosos ou inconclusivos no teste intradérmico (AMADORI et al., 1998).

¹ Bióloga, M.Sc., Bolsista do CNPq na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, farias@cnpgc.embrapa.br

² Médico-Veterinário, Ph.D. em Imunologia, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, flabio@cnpgc.embrapa.br

³ Médica-Veterinária, Ph.D., Bolsista DCR/Fundect na Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, analudmv@nin.ufms.br

⁴ Médica-Veterinária, M.Sc., Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, ksantos@nin.ufms.br

⁵ Médico-Veterinário, M.Sc., Médico Veterinário autônomo, Campo Grande, MS, alexandreazambuja@hotmail.com

⁶ Engenheira-Agrônoma, Ph.D. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, rosinha@cnpgc.embrapa.br

⁷ Médico-Veterinário, Ph.D. em Ciências Veterinárias, pesquisador da Embrapa Gado de Corte. Bolsista do CNPq. Campo Grande, MS, cleber@cnpgc.embrapa.br

A proteína MPB70 representa mais de 10% das proteínas secretadas no meio de cultura de *M. bovis* e foi anteriormente identificada como imunodominante em bovinos tuberculosos e específica para o complexo *M. tuberculosis* (HARBOE et al., 1990; LIGHTBODY et al., 1998). Espera-se, portanto, que a resposta imune contra MPB70 seja um indicador sensível de crescimento bacteriano *in vivo* durante a tuberculose bovina (HARBOE et al., 1990). No presente estudo, demonstrou-se a produção e caracterização de MPB70 recombinante de *M. bovis*.

Metodologia

O isolado de *M. bovis* utilizado nesse trabalho foi proveniente de um bovino positivo no teste intradérmico comparativo, da cidade de Caarapó, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. As lesões deste animal foram cultivadas em meio Stonebrink. Bacilos álcool-ácido resistentes foram identificados por coloração Ziehl-Neelsen e submetidos à PCR com os oligonucleotídeos JB21 e JB22, específicos para o complexo *M. tuberculosis* (RODRÍGUEZ et al., 1995) (dados não mostrados).

Os oligonucleotídeos iniciadores (mpb70F: 5'GTAAAGAACACAATTGCGGCAACCAGTTTC3' e mpb70R: 5'CCGGAGGCATTAGCACGCTGTCAA3') foram desenhados para amplificação do gene *mpb70*. O fragmento de DNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e coloração com *Sybr Gold* (Invitrogen) para visualização em transiluminador UV.

O gene amplificado foi clonado inicialmente em plasmídeo *pGEM-T Easy* (Promega) e posteriormente subclonado em *pGEX-3X* (GE), para produção de proteína recombinante em fusão com glutathione-S-transferase (GST). Como célula hospedeira, foi utilizada *Escherichia coli* cepa DH5 α . A expressão do gene foi verificada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-poliacrilamida), corado com azul de *Coomassie* e por *Western blot* com anticorpo policlonal anti-GST (GE).

O fragmento clonado em *pGEM-T Easy* (Promega) foi seqüenciado em ambas as direções, utilizando *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100*, conforme instruções do fabricante (Applied Biosystems). A busca por homologia da seqüência do gene foi feita com os algoritmos *Blastn* (para seqüências

de nucleotídeos) ou *Blastp* (para seqüência deduzida de aminoácidos) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A seqüência deduzida de aminoácidos obtidas neste estudo e as *best hits* do *Blast* foram alinhadas no programa Clustalw. Para melhor visualização das mutações, inserções e deleções, utilizou-se o programa Boxshade.

Para produção da proteína recombinante, inoculou-se 50 mL de caldo LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina em um erlenmyer com uma colônia da bactéria contendo o plasmídeo recombinante. A suspensão bacteriana foi cultivada a 37°C, por 12 horas, a 250 rpm. Este crescimento foi inoculado em 450 mL de caldo LB com 100 μ g/mL de ampicilina e a suspensão incubada por uma hora a 37°C, 250 rpm. A indução da expressão gênica foi feita com 1 mM de IPTG por incubação a 37°C, por quatro horas a 250 rpm. A suspensão foi então centrifugada a 9.000 x g por 10 minutos e o sedimento suspenso em 20 mL de PBS com 3,2 mg de lisozima. A suspensão foi congelada em nitrogênio líquido e descongelada em gelo, submetida à ruptura ultra-sônica por 10 vezes de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos e potência 100 W, em gelo. Foram adicionados à suspensão 20 mL de tampão da amostra 2x para eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. A amostra foi fervida por cinco minutos e submetida à eletroforese em mini-géis de SDS-poliacrilamida preparativos. Após a separação protéica, os géis foram imersos em acetato de potássio 1 M gelado (NEOPHYTOU et al., 1996) e a banda protéica recombinante foi cortada do gel. Os fragmentos dos géis foram submetidos à eletroeluição, segundo Sá-Pereira et al. (2000), em membrana de diálise a 35 mA, por três horas, a 4°C, com 10 mL de tampão Laemmli. Na cuba de eletroforese, a membrana foi imersa também em tampão Laemmli. Para retirada do SDS, a solução contendo a proteína recombinante foi submetida à eletroeluição com tampão uréia na cuba de eletroforese, por 12 horas, a 35 mA, a 4°C, segundo Tuszyński; Warren (1995). A solução contendo a proteína recombinante foi então submetida à diálise em PBS por 48 horas, a 4°C, sob agitação para retirada da uréia da amostra. Verificou-se a pureza da proteína eletroeluída por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, corado com azul brilhante de *Coomassie*, utilizando-se extrato de *E. coli* com a proteína recombinante para comparação da massa da proteína eletroeluída; bem como por *Western blot* com anticorpo policlo-

nal anti-GST. Posteriormente, a proteína MPB70 purificada foi concentrada em filtro Centricon YM-30 (Millipore). A dosagem de proteína foi feita no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific).

Resultados

O fragmento correspondente à região codificante do gene *mpb70* foi amplificado por PCR, gerando produto de 571 pares de bases (Figura 1). O produto da PCR foi ligado ao plasmídeo de clonagem *pGEM-T Easy* (Promega) e sequenciado. A sequência de nucleotídeos do fragmento do gene *mpb70* está demonstrada na Figura 2.

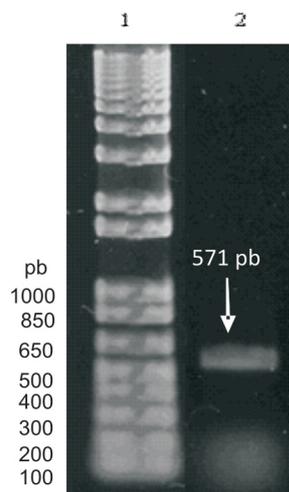


Figura 1. Amplificação do gene *mpb70* por PCR a partir de DNA genômico de *Mycobacterium bovis* (gel de agarose 1% corado com *SybrGold* - Invitrogen). 1. Marcador de pares de bases 1Kb Plus (Invitrogen), 2. Fragmento de 571 pb resultante da amplificação do gene *mpb70*.

>*mpb70*

```

GTAAAGAACAATTGCGGCAACCAGTTTCGCGGCGGCCGGCCTGGCGGCTCTGGCGGTGGCTGTC
TCACCGCCGGCGGCCGCGAGGCGATCTGGTGGGCCCGGGCTGCGCGGAATACGCGGCAGCCAATCC
CACTGGGCCGGCCTCGGTGCAGGGAATGTCGCAGGACCCGGTTCGCGGTGGCGGCCCTCGAACAATC
CGGAGTTGACAACGCTGACGGCTGCACTGTGCGGGCCAGCTCAATCCGCAAGTAAACCTGGTGGAC
ACCCTCAACAGCGGTCAGTACACGGTGTTCGCACCGACCAACGCGGCATTTAGCAAGCTGCCGGCA
TCCACGATCGACGAGCTCAAGACCAATTCGTCACTGCTGACCAGCATCTGACCTACCACGTAAGTG
GCCGGCCAAACCAGCCCGGCCAACGTCGTGCGGCACCCGTCAGACCCTCCAGGGCGCCAGCGTGAC
GGTGACCGGTCAGGGTAACAGCCTCAAGGTCGGTAACGCCGACGTCGTCTGTGGTGGGGTGTCTAC
CGCCAACGCGACGGTGTACATGATTGACAGCGTGCTAATGCCTCCGG

```

Figura 2. Sequenciamento do gene *mpb70* clonado em *pGEM-T Easy*. Número de acesso no ncbi: EU683971.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Na avaliação das sequências pelo *Blastn*, a sequência do gene *mpb70* clonado neste trabalho apresentou 100% de identidade e *e-value*: 0,0 (571/571 nucleotídeos) com homólogos nos genomas de *M. tuberculosis* F11, *M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* subsp. *bovis* AF2122/97 e *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2.

O alinhamento das sequências de *mpb70* dos isolados brasileiro e *M. bovis* AF2122/97, *M. tuberculosis* F11, *M. tuberculosis* H37Ra e *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 foi realizado com o auxílio do programa *Blast 2 sequences 2.2.18* (Figura 3A).

No *Blastp*, a sequência deduzida de aminoácidos de MPB70 do isolado brasileiro apresentou 100% de identidade e *e-value*: 5×10^{-101} (190/190 aminoáci-

dos) com homólogos em *M. tuberculosis* CDC1551, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG e *M. bovis* AF2122/97. O alinhamento múltiplo das sequências acima descritas está demonstrada na Figura 3B.

Após subclonagem do gene no vetor de expressão *pGEX-3X* (GE), o plasmídeo recombinante *pGEX-3X/mpb70* foi inserido em bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α , e induziu-se a expressão do gene por quatro horas. Na análise da expressão do gene por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida foi possível observar uma proteína recombinante de aproximadamente 48 kDa (Figura 4A). No *Western blot*, a proteína recombinante MPB70, fusionada à GST, foi reconhecida no extrato de *E. coli* pelo anticorpo anti-GST, confirmando a expressão do gene (Figura 4B).

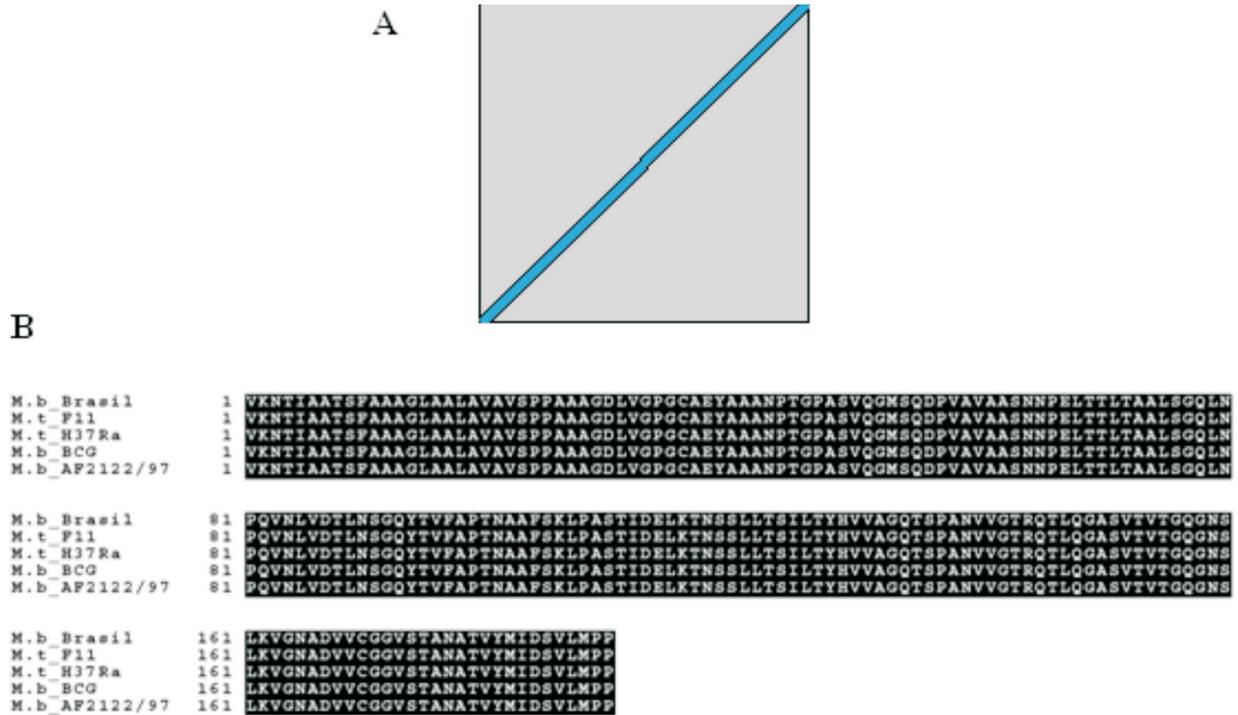


Figura 3. A: Alinhamento das sequências de *mpb70* do isolado brasileiro e *M. bovis* AF2122/97, *M. tuberculosis* F11, *M. tuberculosis* H37Ra e *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 pelo Blast 2 sequences 2.2.18. B: Alinhamento múltiplo das sequências deduzidas de aminoácidos de MPB70 ou MPT70 do isolado brasileiro de *M. bovis*, *M. tuberculosis* CDC1551, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG e *M. bovis* AF2122/97. Obs: a numeração não corresponde ao aminoácido correspondente na proteína completa, e sim à porção codificada pelo fragmento delimitado pelos oligonucleotídeos iniciadores descritos no trabalho. M.t = *Mycobacterium tuberculosis*. M.b = *Mycobacterium bovis*.

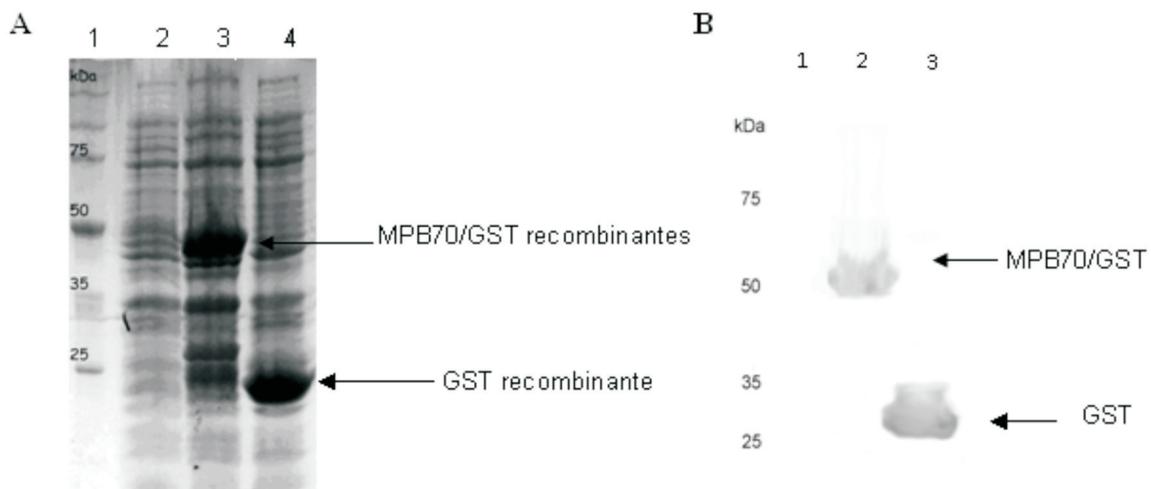


Figura 4. A: Produção de MPB70 recombinante de *Mycobacterium bovis*. Linhas: 1. Marcador de massa molecular; 2. Extrato de *E. coli* transformado com *pGEX-3X-mpb70* sem indução com IPTG; 3. Extrato de *E. coli* transformado com *pGEX-3X-mpb70* após 4 horas de indução com IPTG; 4. Extrato de *E. coli* transformado com *pGEX-3X* após 4 horas de indução com IPTG. B: Western blot com a proteína MPB70 recombinante de *Mycobacterium bovis*, fusionada à GST, e anticorpo policlonal anti-GST. Linhas: 1. Extrato de *E. coli* transformada com *pGEX-3X-mpb70* sem indução com IPTG; 2. Extrato de *E. coli* transformada com *pGEX-3X-mpb70* após 4 horas de indução com IPTG; 3. Extrato de *E. coli* transformada com *pGEX-3X* após 4 horas de indução com IPTG.

Discussão

Atualmente, os estudos relacionados ao diagnóstico da tuberculose bovina concentram-se na padronização de ensaios sorológicos utilizando diversos antígenos (LIGHTBODY et al., 1998; LIGHTBODY et al., 2000; SURUJBALLI et al., 2002). Os antígenos produzidos por engenharia genética para o diagnóstico sorológico da tuberculose bovina podem ser bastante úteis, sendo utilizados em ensaios individuais ou na forma de moléculas fusionadas, o que diminui custos com a produção e purificação dos antígenos.

A proteína MPB70 é um dos antígenos imunodominantes de *M. bovis* (SMITH; JOHNSON, 1988; GRIFFIN et al., 2001) e é um componente da tuberculina bovina extremamente estável e ativa (HARBOE et al., 1990). Além disso, é capaz de produzir resposta de hipersensibilidade tardia e estimular a proliferação de linfócitos T e produção de anticorpos em animais infectados com *M. bovis* (HARBOE et al., 1990; SMITH; JOHNSON, 1988).

O fragmento clonado do gene *mpb70* do isolado brasileiro de *M. bovis* mostrou-se conservado, quando comparado a sequências homólogas, disponíveis nos bancos de dados (*Genbank*), em *M. bovis* e *M. tuberculosis*. A conservação do gene constitui uma importante característica para antígenos destinados a imunodiagnóstico, já que implica que a proteína codificada possuirá epítopos comuns em diferentes cepas/isolados do microrganismo, refletindo diretamente na sensibilidade do teste diagnóstico.

O vetor utilizado para expressão, o *pGEX-3X* (GE), codifica para a proteína GST, como proteína de fusão à proteína de interesse. Essa fusão visa conferir solubilidade à proteína recombinante e permitir sua purificação por cromatografia de afinidade em colunas contendo glutationa (RITACCO et al., 1991). No entanto, não foi possível a purificação desta forma, provavelmente devido à insolubilidade dos corpúsculos de inclusão contendo a proteína recombinante neste estudo (dados não demonstrados). Por esta razão, optou-se pela purificação por eletroeluição, a qual foi factível.

Na análise da expressão do gene, a banda protéica predominante no extrato total de *E. coli* apresentou massa molecular compatível à fusão GST/MPB70

(48 kDa). Essa proteína foi reconhecida especificamente por anticorpo policlonal anti-GST, confirmando ser recombinante.

Como perspectivas, a MPB70 recombinante pode ser utilizada em ensaio indireto de imunoabsorção enzimática, gerando uma ferramenta útil para diagnosticar a tuberculose bovina, associada à intradermoreação com PPD, aumentando a cobertura diagnóstica por meio do aumento da especificidade, visto que a proteína é específica para o complexo *M. tuberculosis*.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio financeiro da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) (processo 41/100.197/2006) e do Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo 505837/2008-0).

Referências

- AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V.; VALLECILLO, A. J.; GUTIERREZ-PABELLO, J. A.; SUAREZ-GÜEMES, F.; MCNAIR, J.; CATALDI, A.; ESPITIA, C.; ANDERSEN, P.; POLLOCK, J. M. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 44, n. 12, p. 4326-4335, 2006.
- AMADORI, M.; TAMENI, S.; SCACCAGLIA, P.; CAVIRANI, S.; ARCHETTI, I. L.; GIANDOMENICO, R. Q. Antibody tests for identification of *Mycobacterium bovis*-infected bovine herds. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 36, n. 2, p. 566-568, 1998.
- FRANCIS, J.; SEILER, R. J.; WILKIE, I. W.; O'BOYLE, D.; LUMSDEN, M. J.; FROST, A. J. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Veterinary Record*, London, v. 103, n. 19, p. 420-425, 1978.
- GRIFFIN, J.F.; NAGAI, S.; BUCHAN, G.S. Tuberculosis in domesticated red deer: comparison of purified protein derivative and the specific protein MPB70 for *in vitro* diagnosis. *Research in Veterinary Science*, Oxford, v.50, n.3, p. 279-285, 1991.
- HARBOE, M.; WIKER, H. G.; DUNCAN, J. R.; GARCIA, M. M.; DUKES, T. W.; BROOKS, B. W.; TURCOTTE, C.; NAGAI, S. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 28, n. 5, p. 913-921, 1990.

JORGE, K. S. G.; ALMEIDA, R. F. C.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; OSÓRIO, A. L. A. Tuberculose bovina: epidemiologia e controle. In: ALMEIDA, R. F. C.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R. **Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004a. 95p., p. 45-59.

JORGE, K. S. G.; OSÓRIO, A. L. A.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; ALMEIDA, R. F. C. Tuberculose bovina: diagnóstico. In: ALMEIDA, R. F. C.; **Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004b. 95p., p. 61-80.

LIGHTBODY, K. A.; SKUCE, R. A.; NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. **Veterinary Record**, London, v. 142, n. 12, p. 295-300, 1998.

LIGHTBODY, K.A.; MCNAIR, J.; NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunised and in tuberculin skin test-reactor cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 177-88, 2000.

MONAGHAN, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D.; KAZDA, J. F.; QUINN, P. J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 111-124, 1994.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M. Testing for bovine tuberculosis—more than skin deep. **Veterinary Journal**, London, v. 160, n. 1, p. 3-5, 2000.

NEOPHYTOU, P. I.; OZEGBE, P.; HEALEY, D.; QUARTEY-PAPAFIO, R.; COOKE, A.; HUTTON, J. C. Development of a procedure for the direct cloning of T-cell epitopes using bacterial expression systems. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 196, n. 1, p. 63-72, 1996.

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, Churchill Livingstone, v. 76, n. 1, p. 1-46, 1995.

PLACKETT, P.; RIPPER, J.; CORNER, L. A.; SMALL, K.; DE WITTE, K.; MELVILLE, L.; HIDES, S.; WOOD, P. R. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v. 66, n. 1, p. 15-19, 1989.

RITACCO, V.; LÓPEZ, B.; DE KANTOR, I. N.; BARRERA, L.; ERRICO, F.; NADER, A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 365-367, 1991.

RODRÍGUEZ, J. G.; MEJIA, G. A.; DEL PORTILLO, P.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, Washington, v.141, n. 9, p. 2131-2138, , 1995.

SÁ-PEREIRA, P.; DUARTE, J.; COSTA-FERREIRA, M. Electroelution as a simple and fast protein purification method: isolation of an extracellular xylanase from *Bacillus* sp. CCM 966. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, n. 1-2, p. 95-99, 2000.

SMITH, D. B.; JOHNSON, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. **Gene**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 31-40, 1988.

SURUJBALLI, O.P.; ROMANOWSKA, A.; SUGDEN, E.A.; TURCOTTE, C.; JOLLEY, M.E. A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, n. 2, 2002.

TUSZYNSKI, G. P.; WARREN, L. Removal of sodium dodecyl sulfate from proteins. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 67, n. 1, p. 55-65, 1975.

WOOD, P. R.; JONES, S. L. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 181, n. 1-2, p. 147-155, 2001.

CGPE 8495

Comunicado Técnico, 119

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@cnpqc.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