

Fotos: Alexandre Nizio Maria



Criopreservação do Sêmen de Tambaqui em Criotubos para Utilização em Grande Escala

Alexandre Nizio Maria¹
Rodrigo Yudi Fujimoto²
Paulo César Falanghe Carneiro³
Hymerson Costa Azevedo⁴
Danillo dos Santos Santana⁵
Heverton de Oliveira Santos⁶
Rafael Venâncio de Araújo⁷

Introdução

Estudos que envolvem o processo de conservação do sêmen de peixes pela técnica de criopreservação tiveram início na década de 1950, com a descoberta dos primeiros meios criogênicos. Desde o primeiro estudo bem sucedido realizado por John Blaxter em 1953, vários pesquisadores se dedicaram a entender e aprimorar essa técnica. O processo consiste na conservação das células espermáticas em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura na qual a estrutura e funcionalidade das células e tecidos vivos são mantidas, conservando-as geneticamente viáveis e reversivelmente inativas do ponto de vista metabólico (PEGG, 2007). A conservação do sêmen por tempo indeterminado permite a otimização no transporte do material genético e a manutenção do estoque de sêmen de um grande número de exemplares, garantindo a variabilidade e o intercâmbio genético entre pisciculturas. Além disso, possibilita o fornecimento contínuo de sêmen durante toda a estação reprodutiva e a redução dos custos na manutenção dos plantéis de reprodutores.

No Brasil, a preocupação com a preservação da variabilidade genética das populações selvagens ameaçadas de extinção ou de descaracterização e erosão genética impulsionaram os estudos relacionados à criopreservação do sêmen de

espécies nativas nos anos 1990. Atualmente, vários protocolos de criopreservação de sêmen já foram estabelecidos em estudos realizados por empresas e instituições de ensino e pesquisa no país, refletindo em uma melhoria considerável da tecnologia quando aplicada às espécies cultivadas comercialmente.

Esse avanço tecnológico refletiu diretamente no sucesso experimental da fertilização de ovócitos e da produção de formas jovens a partir do sêmen criopreservado, gerando demandas por aplicação dessa técnica em escala comercial. Diante dessa demanda tecnológica do setor produtivo, a Embrapa tem trabalhado nos últimos anos com o desenvolvimento de protocolos para a criopreservação do sêmen de peixes em recipientes de maior volume como macropalhetas e criotubos que se adequam melhor ao manejo reprodutivo das pisciculturas (MARIA et al., 2015; DIAS FILHO et al., 2015).

A espécie selecionada como ponto de partida para aplicação dessa técnica em escala comercial foi o tambaqui (*Colossoma macropomum*), devido a sua importância comercial em todo país, sendo responsável por 29,3% da produção total de peixes em cativeiro no Brasil, ficando atrás apenas da tilápia (*Oreochromis niloticus*) com 41,9% (IBGE, 2014). Além disso, desde 2008, o tambaqui integra o primeiro programa de melhoramento genético

¹Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

²Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

³Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

⁴Médico Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

⁵Graduando em Engenharia de Pesca, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE

⁶Graduando em Medicina Veterinária, Faculdade Pio Décimo, Aracaju, SE

⁷Zootecnista, doutor em Zootecnia, professor Adjunto da Universidade Federal de Mato Grosso, Rondonópolis, MT

de peixes nativos desenvolvido no Brasil, que conta com o envolvimento de diversas instituições públicas e da iniciativa privada, tendo como meta a disponibilidade de linhagens de animais melhorados da espécie. Esse fato vai de encontro com a demanda crescente do mercado atual que busca animais de elevado desempenho zootécnico e mais adaptados ao ambiente do cativeiro. Do ponto de vista comercial, a produção de linhagens melhoradas geneticamente poderá viabilizar o estabelecimento da comercialização do sêmen de peixes em nosso país.

Por ser uma espécie com alta fecundidade (mais de um milhão de ovócitos por desova), a técnica de criopreservação de sêmen em grandes recipientes se mostra bastante promissora para o tambaqui, facilitando o manejo e tornando o processo de fertilização e armazenamento de sêmen criopreservado mais atraente do ponto de vista econômico. A grande quantidade de ovócitos liberados pelas fêmeas, principalmente de espécies reoflicas como o tambaqui, exige a utilização de um grande número de espermatozoides e consequentemente várias doses de sêmen congelado. Os criotubos têm capacidade de armazenar uma maior quantidade de sêmen quando comparado as tradicionais palhetas, evitando a utilização de uma grande quantidade de doses para atender o volume de material desovado, o que dificulta o manuseio e a utilização deste material genético nos processos de fertilização artificial dentro do manejo reprodutivo das pisciculturas.

A utilização de recipientes de maior volume no processo de criopreservação é uma técnica muito valiosa para a preservação de material genético, podendo ser utilizada em programas de melhoramento de espécies de interesse econômico ou em laboratórios públicos e privados de produção de alevinos (MARIA et al., 2009). Além disso, traz para o setor aquícola novas perspectivas de utilização do sêmen durante a rotina dos laboratórios de reprodução, contribuindo para o aumento da disponibilidade de alevinos de alta qualidade e para o desenvolvimento sustentável da piscicultura nacional. Assim, o objetivo desta publicação é descrever um protocolo adequado para criopreservação do sêmen de tambaqui em criotubos, visando sua utilização em grande escala no sistema de produção.

Características dos criotubos

Diversas formas de recipientes vêm sendo avaliadas quanto a sua capacidade de manter a qualidade espermática durante o processo de congelamento e descongelamento. Cada recipiente é constituído de diferentes formas, dimensões e materiais que podem produzir diferentes taxas de transferência de

calor, modificando a velocidade de congelamento e descongelamento dos espermatozoides.

Os diferentes tipos de recipientes utilizados na criopreservação de células espermáticas devem assegurar a identificação da amostra e a uniformização da velocidade de congelamento e descongelamento. As palhetas francesas de 0,5 mL são as mais utilizadas na criopreservação do sêmen de peixe, no entanto, devido a sua pequena capacidade de armazenamento, é necessário um número maior de palhetas para fertilização de todos os ovócitos de uma desova. Dentro deste contexto, o congelamento de sêmen em recipientes com maior capacidade de armazenamento como os criotubos, que apresentam volumes variáveis de 1 mL a 5 mL, é de grande importância para produção em grande escala.

O criotubo inicialmente surgiu como alternativa à criopreservação de sêmen humano e foi difundido para outras espécies de mamíferos e de peixes. Essa difusão ocorreu, principalmente, pela maior quantidade de sêmen que pode ser armazenado neste recipiente, além da facilidade no manuseio durante o envase e a possibilidade de ser esterilizado e reaproveitado em mais de um processo de criopreservação.

Geralmente esses criotubos são fabricados em polipropileno, sendo resistentes a temperaturas que vão de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $+121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essas condições exigem cuidados especiais tanto para a preservação e armazenamento correto da amostra, quanto na manipulação pelos usuários, tais como: sempre utilizar jaleco, pinça, luvas e óculos de proteção (Figura 1) ao manipular os criotubos a fim de minimizar possíveis riscos de acidentes; deve-se fazer a correta identificação do criotubo com as informações básicas de data de processamento e, quando possível, do peixe doador do sêmen; o criotubo deve ser preenchido no máximo em 90% da sua capacidade total para permitir a expansão do volume da amostra causada pelo congelamento; antes de iniciar o congelamento o técnico deve se assegurar de que a tampa do criotubo esteja seca e hermeticamente fechada, evitando que o nitrogênio líquido entre no tubo, o que pode acarretar em danos aos espermatozoides e em explosão durante o processo de descongelamento devido à expansão rápida do nitrogênio. Para fins de armazenamento no botijão de nitrogênio líquido, os criotubos devem ser dispostos em hastes de sustentação tais como racks de alumínio ou de plástico (Figura 2).

Foto: Heverton de Oliveira Santos



Figura 1. Equipamento de proteção individual: jaleco; óculos de proteção; pinça para manipulação dos criotubos e luva.

Foto: Danilo dos Santos Santana

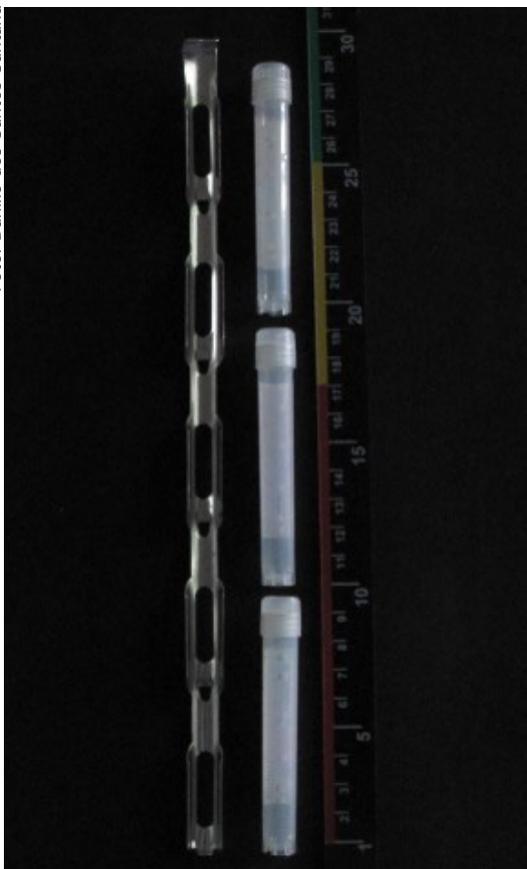


Figura 2. Criotubos de 5 mL ao lado de uma rack de alumínio para acondicionamento em botijão de nitrogênio líquido.

Procedimentos para congelamento e descongelamento do sêmen

Indução hormonal e coleta do sêmen

O protocolo de indução hormonal deve seguir a rotina adotada em cada piscicultura ou estar de acordo com as recomendações disponíveis em literatura especializada.

Para a coleta do sêmen, alguns cuidados devem ser adotados para evitar a sua contaminação e/ou ativação precoce:

- Secar o recipiente no qual será coletado o sêmen colocando a identificação do peixe doador.
- Secar bem a região da papila urogenital com papel toalha.
- Realizar a coleta em mais de um recipiente, evitando desta forma a perda de todo material biológico no caso de contaminação com urina, fezes ou sangue.
- Realizar coletas individuais, evitando a mistura do sêmen de diferentes reprodutores;
- Após a coleta, manter os recipientes em caixa de isopor com gelo evitando sempre o contato direto entre gelo e recipiente.

Preparação das soluções crioprotetoras

As células espermáticas necessitam da adição de uma solução com ação crioprotetora para o seu congelamento adequado. Essa solução pode ser composta por 65% de solução glicosada (solução de glicose 5%), 10% de metilglicol e 5% de gema de ovo (ARAUJO et al., 2013). O preparo da solução crioprotetora deve seguir as seguintes etapas:

- Dividir o conteúdo total da solução de glicose em dois recipientes (becker) secos e estéreis.
- No recipiente 1 adicionar a gema de ovo e misturar de forma homogênea para obter a **solução A** (gema de ovo + solução glicosada).
- No recipiente 2 adicionar o metilglicol para obter a **solução B** (metilglicol + solução glicosada), lacrar com tampa ou papel filme para evitar a evaporação e deixar em repouso por 15 minutos.
- Após 15 minutos, misturar as soluções **A** e **B**, homogeneizar e tampar.
- Depois de pronto, o meio crioprotetor pode ser utilizado imediatamente após o seu preparo ou pode ser congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ser utilizado posteriormente.

Avaliação do sêmen pré-congelamento

Algumas injúrias nas células espermáticas podem ocorrer durante o processo de congelamento, diminuindo a qualidade do sêmen congelado quando comparado ao sêmen in natura. A utilização de células espermáticas de boa qualidade contribui para minimizar perdas durante o processo criogênico aumentando a qualidade da dose inseminante. Nesse sentido, a avaliação da qualidade seminal antes do congelamento deve ser realizada pela determinação da motilidade e concentração espermática do sêmen de cada reprodutor.

Para a avaliação da motilidade espermática, é necessária a utilização de um microscópio óptico com aumento de 400x. Uma gota de sêmen é colocada em uma lâmina de vidro para comprovar que os espermatozoides estão imóveis. Qualquer movimento sugere contaminação com água, sangue ou urina e a amostra deve ser descartada. A avaliação da motilidade espermática subjetiva é realizada após adição de solução de bicarbonato de sódio a 1,05% (125 mM; 230 mOsm) (CARNEIRO et al., 2012) ao sêmen, estimando-se o percentual de espermatozoides em movimento logo após a ativação (0% a 100%). Somente amostras de sêmen com pelo menos 80% das células em movimento são utilizadas na criopreservação.

A determinação da concentração espermática pode ser estimada por meio da utilização de uma câmara de Neubauer. Para isso deve-se diluir o sêmen em formol-citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4 mL de solução comercial de formaldeído 35% e água destilada q.s.p. 100 mL) na proporção de 1:1000 (sêmen:formol-citrato). Após a diluição, realizar a contagem de células espermáticas presentes em dez campos da câmara de Neubauer como recomendado pelo CBRA (1998) para mamíferos:

$$\text{Concentração espermática} \left(\frac{\text{SPTZ}}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{\sum \text{SPTZ}}{10 \text{ qc}} \right) \times \frac{25 \text{ qt} \times \text{diluição} \times 1000}{\text{profundidade da câmara (mm)}}$$

Em que: SPTZ = espermatozoides; \sum SPTZ = número total de espermatozoides contados; 10 qc = 10 quadrículas contadas; 25 qt = 25 quadrículas totais; diluição = fator de diluição do sêmen pelo fixador e profundidade da câmara = 0,10 mm.

Envase dos criotubos

O sêmen deve ser adicionado lentamente na proporção de 20% na solução crioprotetora e homogeneizado com leves movimentos circulares para evitar lesões celulares. Dessa forma, a solução final será composta por: 65% de solução glicosada, 10% de metilglicol, 5% de gema de ovo e 20% de sêmen. Realiza-se o envase dos criotubos com auxílio de uma pipeta (Figura 3) ou simplesmente vertendo a solução diretamente no criotubo, enchendo até a marca superior da escala existente no recipiente. Os criotubos são fixados nas racks de alumínio (Figuras 4) e posteriormente transferidos para o botijão *dry shipper* saturado com nitrogênio líquido dando início ao processo de congelamento. Todo o procedimento de diluição e envase até o início do congelamento do sêmen deve ser realizado dentro de 20 minutos.



Foto: Heverton de Oliveira Santos

Figura 3. Envase do criotubo com auxílio de uma pipeta.



Foto: Danilo dos Santos Santana

Figura 4. Acondicionamento dos criotubos nas racks de alumínio para a criopreservação.

Congelamento do sêmen

Para o congelamento do sêmen, recomenda-se a utilização de um botijão de vapor de nitrogênio líquido *dry shipper* (Figura 5), que confere velocidade média de congelamento em torno de $-9,0$ °C/min, considerada adequada para o sucesso no processo de congelamento.

Foto: Heverton de Oliveira Santos



Figura 5. Botijão de vapor de nitrogênio líquido *dry shipper*.

Deve-se preparar o botijão *dry shipper* antes da colheita do sêmen. Ele possui um material poroso absorvente as paredes internas que tem por função reter o nitrogênio líquido. Por esse motivo o abastecimento com N_2L deve ser realizado quantas vezes forem necessárias até sua saturação total. Na prática, o botijão deve ser abastecido até o seu completo enchimento. À medida que fica retido no material poroso o nível de N_2L dentro do botijão tende a diminuir. Nesse momento deve-se repetir a operação de enchimento até a estabilização total do nível que pode ser aferido com uma régua graduada específica para esse fim. No momento do congelamento, o *dry shipper* deve ser esgotado por completo, permanecendo em seu interior apenas o vapor de N_2L . Após esse procedimento, as racks já podem ser transferidas para o interior do *dry shipper* onde permanecerão por período mínimo de uma hora até serem transferidas para o botijão criogênico que estará a -196 °C, permanecendo nesta temperatura até o seu uso.

Descongelamento do sêmen

As etapas para o descongelamento do sêmen estão descritas a seguir:

- Retirar o criotubo do botijão criogênico com o auxílio de uma pinça e mergulhá-lo imediatamente em água a 60 °C durante 90 segundos (Figura 6).



Foto: Danilo dos Santos Santana

Figura 6. Descongelamento do criotubos em banho de água.

- Com o recipiente totalmente imerso, realizar movimentos constantes, garantindo assim o descongelamento homogêneo da amostra.
- Secar o criotubo com papel toalha para evitar a ativação precoce do sêmen com água residual
- A amostra está pronta para ser utilizada.

Materiais para congelamento e descongelamento do sêmen

Os materiais necessários para o congelamento e descongelamento do sêmen em criotubos estão descritos detalhadamente na Tabela 1.

Tabela 1. Materiais necessários para congelamento e descongelamento do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em criotubos.

Procedimento	Item	Função
Congelamento do sêmen	Solução glicosada a 5% estéril (glicose 5%)	Preparação da solução de congelamento
	Gema de ovo	
	Metilglicol (éter metílico de etilenoglicol)	
	Tubos de vidro, becker e proveta	Preparação das soluções de congelamento
	Criotubos de 5 mL (fabricado em polipropileno; esterilizado; livre de pirogênios e toxinas; tampa com rosca; suportar temperaturas na faixa de -196°C a +121°C)	Acondicionamento do sêmen diluído
	Racks de alumínio para criotubos	Armazenamento dos criotubos
	Nitrogênio líquido (N ₂ L)	Abastecimento do botijão de vapor de N ₂ L (dry shipper) e do botijão de armazenamento
Descongelamento do sêmen	Botijão de vapor de N ₂ L, dry shipper	Congelamento das doses de sêmen
	Botijão criogênico de armazenamento	Armazenamento das doses de sêmen congeladas
	Pinça	Retirada das doses de sêmen dos botijões e manipulação dentro no banho de água
	Banho Maria com água a 60 °C	Descongelamento dos criotubos
	Papel toalha	Secagem dos criotubos

Fertilização artificial

Paralelamente ao descongelamento das amostras de sêmen, devem ser conduzidas as atividades relacionadas às fêmeas. Os ovócitos a serem fertilizados devem ser recolhidos em um recipiente limpo e seco (Figura 7), para evitar sua ativação e hidratação e consequente fechamento do local de entrada do espermatozoide (micrópila).



Foto: Alexandre Nizio Maria

Figura 7. Extrusão dos ovócitos de uma fêmea de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Para o processo da fertilização, adicionar o sêmen descongelado sobre os ovócitos misturando-os cuidadosamente para melhor homogeneização. A fertilização inicia-se com a ativação dos espermatozoides e hidratação dos ovócitos submetendo-os ao contato com um meio ativador (Figura 8). O meio ativador mais utilizado no processo de fertilização é a água do próprio local onde se encontravam as fêmeas ou soluções de sais preparadas especificamente para esse fim. Dentre as soluções salinas podemos citar a solução de bicarbonato de sódio a 1,05% (125 mM; 230 mOsm) (CARNEIRO et al., 2012; SANTOS et al., 2013), que tem se mostrado um ativador espermático bastante eficiente para diversas espécies de peixes tropicais.

Foto: Alexandre Nizio Maria



Figura 8. Adição do meio ativador aos gametas: Início do processo de ativação dos espermatozoides, hidratação dos ovócitos e fertilização.

De acordo com Santos (2013), a relação do número de espermatozoides descongelados necessários para fertilizar um ovócito de tambaqui é de 250.000:1. A partir dessa informação, podemos calcular aproximadamente quantos gramas de ovócito podem ser fertilizados com uma dose de 4,5 mL de sêmen descongelado (volume total do criotubo 5,0 mL). Para melhor compreensão tomamos como exemplo a situação descrita a seguir:

Supondo que um macho de tambaqui produza 9 mL de sêmen e que a concentração espermática do ejaculado seja de 8×10^9 espermatozoides/mL. De acordo com o protocolo de congelamento proposto, o sêmen fresco será diluído 5 vezes, ou seja, na proporção de 1:5, e depois envasado em 10 criotubos de 4,5 mL. Dessa forma, o sêmen contido em cada criotubo descongelado (20% de 4,5 mL = 0,9 mL de sêmen = $7,2 \times 10^9$ espermatozoides) será capaz de fertilizar 28.800 ovócitos. Como cada grama de ovócitos de tambaqui contém cerca de 1.200 ovócitos, o sêmen descongelado contido em cada criotubo tem capacidade de fertilizar 24 gramas de ovócitos.

Considerações finais

O aprimoramento das técnicas de criopreservação do sêmen de espécies nativas de alto potencial econômico como o tambaqui, aliado ao programa de melhoramento genético desenvolvido atualmente no país, é um estímulo ao setor produtivo a investir no segmento de comercialização de sêmen de peixes de alto desempenho zootécnico. A criopreservação do sêmen de peixes em criotubos vai de encontro a esse anseio por se tratar de uma técnica que torna o processo de fertilização e armazenamento de sêmen criopreservado mais atraente do ponto de vista econômico, permitindo sua utilização em escala comercial. Adicionalmente, essa tecnologia permite a manutenção de bancos de germoplasma, imprescindíveis para a conservação da diversidade genética da espécie.

Agradecimentos

À Piscicultura Santa Clara e Codevasf pela disponibilização dos reprodutores, e à FAPITEC e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- ARAUJO, F. H.; MORAIS, C. A. R. S.; FERNANDES, D. L.; ARAUJO, R. V.; CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; MARIA, A. N. Taxa de Diluição e Tipo de Recipiente de Envase na Criopreservação do Sêmen de Tambaqui. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 3., 2013, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013. p. 132-138.
- CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; MARIA, A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **CryoLetters**, Cambridge, v. 33, p. 385-393, 2012.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.
- DIAS FILHO, V. A.; SANTANA, D. S.; CAVALCANTE, S. S.; NASCIMENTO, A. L. C.; FUJIMOTO, R. Y.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F.; MARIA, A. N. Protocolo para congelamento e descongelamento do sêmen de tambaqui em macropalhetas. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 5., 2015, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa, 2015. p. 150-160.

IBGE. **Produção da pecuária municipal.** Rio de Janeiro, v. 42, p. 1-39, 2014.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P. et al. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, p. 779-783, 2010.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo.** Amapá: Embrapa Amapá, 2009. v. 1, p. 47- 63.

MARIA, A. N.; CARVALHO, A. C. M.; ARAUJO, R. V.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). **Cryobiology**, New York, p.109-114, 2015.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed.). **Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols.** 2. ed. Totowa: Humana Press Inc., 2007.

SANTOS, J. P. **Cinética espermática e fertilização de ovócitos de tambaqui *Colossoma macropomum* com sêmen in natura e criopreservado.** 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

Comunicado Técnico, 159

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Endereço: Avenida Beira Mar, 3250,
CEP 49025-040, Aracaju, SE
Fone: (79) 4009-1344
Fax: (79) 4009-1399
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF

1ª edição
On-line (2015)



Comitê de publicações

Presidente: Marcelo Ferreira Fernandes
Secretária-executiva: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Membros: Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Carlos Alberto da Silva, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, João Costa Gomes, Josué Francisco da Silva Junior, Julio Roberto Araujo de Amorim, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo

Expediente

Supervisora editorial: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Tratamento das ilustrações: Raquel F. de A. Rodrigues
Editoração eletrônica: Raquel F. de A. Rodrigues