

Protocolo de extração de DNA e genotipagem de SSRs em larga escala para uso no melhoramento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

Paula Arielle Mendes Ribeiro Valdisser¹
Ana Paula Simplício Mota²
Luíce Gomes Bueno³
Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes⁴
Gesimária Ribeiro Costa Coelho⁵
Fernanda Oliveira da Cunha Magalhães⁶
Rosana Pereira Vianello⁷

Introdução

A demanda crescente dos programas de melhoramento genético pela implementação da seleção assistida por marcadores (SAM) é decorrente da necessidade de se aumentar a eficiência e reduzir o tempo nos processos de desenvolvimento e seleção de genótipos com características favoráveis. Embora a SAM não seja amplamente utilizada no melhoramento de feijoeiro comum, o avanço na identificação de genes-alvo de relevância agrônômica e a possibilidade crescente de amostrar grandes proporções dos genomas tem favorecido o uso dessa estratégia, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento genético.

Com os significativos avanços das tecnologias de genotipagem de DNA em larga escala, acompanhados por reduções acentuadas de custos e novos conceitos de geração e utilização da informação genômica, as perspectivas de avanços são promissoras na operacionalização da SAM. Por meio da utilização de técnicas de análise genômica

baseadas na tecnologia de marcadores moleculares, está sendo alcançado um aprimoramento das avaliações, com estimativas mais precisas da variabilidade genética existente entre indivíduos em nível de DNA (BRONDANI; BRONDANI, 2004). As informações geradas por meio dos marcadores moleculares têm sido úteis em diferentes etapas do programa de melhoramento, envolvendo desde a coleta, caracterização e uso dos recursos genéticos, até a caracterização de linhagens melhoradas e controle varietal de sementes.

A utilização da seleção assistida por marcadores moleculares em programas de retrocruzamentos tem auxiliado na redução do número de gerações, facilitando e acelerando a introgressão de genes de interesse (OLIVEIRA et al., 2008). Adicionalmente, o emprego dessa estratégia foi demonstrado com sucesso através do processo de piramidação de alelos de resistência em feijoeiro comum derivando linhagens com amplo espectro de resistência (ALZATE-MARIN et al., 2005). Por meio dos marcadores moleculares ligados aos alelos a serem piramidados, a seleção do

¹ Farmacêutica, Especialista em Biotecnologia, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, paula.valdisser@embrapa.br

² Graduada em Agronomia pela UFG, bolsista de iniciação científica da Embrapa Arroz e Feijão, GO, anapaula_pjb@hotmail.com

³ Agrônoma, Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pós-doutoranda Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, lugobueno@bol.com.br

⁴ Biólogo, Mestre em Biologia Molecular, professor do Instituto Federal Goiano, Urutaí, GO, ivppmbio@yahoo.com.br

⁵ Agrônoma, Doutora em Fitopatologia, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, gesimaria.coelho@embrapa.br

⁶ Química, Especialista em Tratamento de Resíduos, analista da Embrapa Algodão, Santo Antônio de Goiás, GO, fernanda.magalhaes@embrapa.br

⁷ Bióloga, Doutora em Biologia Molecular Vegetal, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, rosana.vianello@embrapa.br

alelo-alvo é feita de modo indireto pela identificação dos marcadores, evitando as dificuldades inerentes ao processo de seleção via análises fenotípicas baseadas nas reações da planta a um agente nocivo.

Na etapa final dos programas de melhoramento, os marcadores moleculares vêm sendo utilizados com sucesso em análises de caracterização de linhagens de VCU e na determinação do perfil molecular de cultivares de feijoeiro comum. O emprego das ferramentas moleculares para esse fim pode ser um importante aliado para os melhoristas na avaliação precisa do nível de variabilidade genética contida nos ensaios, bem como na determinação da identidade genética dos materiais genéticos, podendo essa informação ser utilizada para fins de registro e proteção de cultivares (VIANELLO-BRONDANI et al., 2013). Os marcadores moleculares têm sido ainda utilizados como uma ferramenta de auxílio na determinação da pureza varietal por detectarem variação no DNA com um elevado grau de precisão e confiabilidade, podendo ser implementados como uma ferramenta auxiliar aos testes de certificação de lotes de sementes genéticas e básicas feitos a partir de métodos tradicionais (CHEDIAK et al., 2007).

Dentre os marcadores moleculares atualmente disponíveis para genotipagem molecular em feijoeiro comum, destacam-se os marcadores microssatélites (Simple Sequence Repeats – SSRs), que são abundantes e amplamente distribuídos no genoma, multialélicos, codominantes e baseiam-se no princípio da PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A identificação de marcadores robustos, com elevado poder de discriminação individual e que apresentem um satisfatório padrão de amplificação em genótipos de origem genética diversas é fundamental para uma adequada composição dos sistemas de genotipagem (GARCIA et al., 2011). Para o feijoeiro comum, o emprego mais dinâmico e eficiente dos marcadores SSRs para fins de genotipagem molecular, aliado ao sistema de detecção semi-automatizada, evoluiu para a amplificação simultânea de vários locos (VIANELLO-BRONDANI et al., 2013), apresentando como vantagens maior rapidez nas análises, aumento na precisão dos dados gerados e redução de erros na tomada dos dados.

Devido às demandas dos programas de melhoramento para a genotipagem de amostragens amplas, em períodos de tempo reduzidos e

com objetivos diversos, métodos que tornem possível a execução desses processos requerem desenvolvimento e operacionalização durante a condução das atividades laboratoriais. Diante disso, o objetivo deste comunicado é o de ajustar e estabelecer procedimentos laboratoriais de extração de DNA e genotipagem molecular em larga escala favorecendo a implementação de uma rotina eficiente de seleção assistida por marcadores pelo programa de melhoramento genético do feijoeiro comum.

Coleta das amostras

Foram realizadas coletas no campo e em casa de vegetação de tecidos foliares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) através do uso de uma ferramenta perfuradora (“puncher”) (Figura 1). Com o uso desta ferramenta foram coletados dois discos de 6 mm de diâmetro de cada amostra imediatamente depositados em microtubos de 2,0 ml ou placas de PCR. Os recipientes contendo os discos foliares coletados foram centrifugados à 13.000 rpm por 1 minuto com a finalidade de favorecer a acomodação das folhas na etapa que antecede a extração de DNA ou do armazenamento a -20 °C, para extração posterior.



Figura 1. Coleta de discos foliares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando “puncher”.

Extração alcalina de DNA

Foram avaliadas e ajustadas condições de extração baseadas no protocolo de extração alcalina segundo método desenvolvido e descrito por Xin et al. (2003). A primeira etapa do protocolo consistiu em adicionar as soluções tamponantes aos tubos contendo os

discos foliares. Foram adicionados 100 μL da solução Tampão A (50 mM NaOH, 1% Tween® 20), seguido por incubação em “banho-maria” a 95 °C por 10 minutos. A finalização do procedimento de extração deu-se com a adição de 50 μL da solução Tampão B (100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA). Foi avaliada também a extração foliar em *bulk* de quatro a dez plantas (com um disco foliar por planta), sendo que nessas situações os volumes foram ajustados para 400 μL de Tampão A e 200 μL de Tampão B. Para a extração de DNA a partir de sementes de feijoeiro comum foram utilizados de 10 mg (amostras individuais) a 100 mg (amostra em *bulk* de 10 sementes) de sementes moídas ou cortadas em pequenos pedaços. Nesse caso, as amostras de sementes ficaram imersas em 500 μL da solução Tampão A por cerca de 10 horas antes de dar prosseguimento à etapa de incubação, seguido pela adição de 250 μL de Tampão B.

A concentração dos DNAs extraídos foi determinada em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, ThermoScientific), seguida por análise visual da qualidade do DNA em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Não houve necessidade de diluição e padronização das concentrações dos DNAs extraídos, sendo que os mesmos foram diretamente utilizados na reação de PCR, ou armazenados em freezer (-20 °C) para uso posterior.

Sistemas multiplex baseado em SSRs para feijoeiro comum

Foram desenvolvidos três sistemas multiplex contendo oito marcadores cada para a análise de feijoeiro comum. Para compor os três sistemas octaplex, foram selecionados vinte e quatro pares de primers SSRs previamente caracterizados para o feijoeiro comum, sendo 12 da série BM (GAITÁN-SOLÍS et al., 2002), oito da série PvBR (BUSO et al., 2006) e quatro da série Pv-ESTBR (GARCIA et al., 2011). Esta seleção foi baseada no padrão de amplificação específico, diversidade gênica $\geq 0,6$ e ampla distribuição no genoma. A composição dos sistemas multiplex foi feita considerando o tamanho esperado dos fragmentos em pares de base (pb) e a existência de complementariedade entre os primers analisada através do software AutoDimer (VALLONE; BUTLER, 2004). Após a montagem dos sistemas multiplex, os primers foram submetidos à marcação com as fluorescências FAM, NED, VIC e PET (Tabela 1).

Tabela 1. Sistemas de genotipagem contendo 24 SSRs distribuídos em três painéis utilizados para a caracterização molecular de feijoeiro comum, com a denominação dos locos e suas respectivas fluorescências, faixa de amplificação em pares de base (pb) e padrões de amplificação.

Painéis	Faixa de Amplificação	Padrão de Amplificação	Fluorescência
Painel 1			
PV272	078-115	stutter	6-FAM
BM210	168-188	stutter	6-FAM
BM143	110-160	específico	VIC
PV243	204-255	stutter	VIC
BM113	078-099	específico	NED
PV087	158-184	stutter	NED
BM189	091-113	específico	PET
BM187	162-212	stutter	PET
Painel 2			
BM183	142-156	específico	6-FAM
PV035	204-250	específico	6-FAM
BM201	096-114	stutter	NED
BM154	160-307	específico	NED
BM185	097-115	específico	VIC
PV005	168-193	específico	VIC
BM202	138-156	stutter	PET
BM114	209-261	específico	PET
Painel 3			
PV025	153-177	stutter	6-FAM
PV-ESTBR-010	270-280	específico	6-FAM
PV-ESTBR-006	90-120	stutter	NED
PV163	210-330	stutter	NED
BM165	171-187	específico	PET
PV-ESTBR-101	290-310	específico	PET
PV013	169-195	específico	VIC
PV-ESTBR-176	360-390	stutter	VIC

Condições de amplificação por PCR

Para amplificação dos locos SSRs foi utilizado o kit Qiagen® PCR Multiplex (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante em um volume final de 5 μL , contendo 3 ng de DNA e concentrações de pares de primers individuais variando de 0,06 μM a 1,2 μM , dependendo da intensidade do produto amplificado. As amplificações foram conduzidas em termociclador ABI 9700 (Applied Biosystems) compreendendo uma etapa inicial de desnaturação do DNA e ativação da enzima HotStar Taq DNA Polimerase a 95 °C por 15 minutos, seguida por 40 ciclos de três etapas: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento à 56 °C por 1 minuto e 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Ao final dos ciclos, foi realizada uma etapa de extensão a 72 °C por 10 minutos. Após a PCR, os produtos derivados da amplificação foram diluídos na proporção de 10 vezes com água Milli-Q estéril para reduzir o nível de intensidade da fluorescência e proporcionar melhor padrão de detecção dos fragmentos. Em seguida um mix foi preparado contendo uma alíquota de 0,5 μL do produto da PCR diluído, 9,4 μL de formamida (Hi-Di®, Applied Biosystems) e 0,1 μL do marcador padrão (LIZ 500®, Life Technology). Os fragmentos amplificados foram separados via eletroforese capilar conduzida em analisador automático de DNA (ABI 3100 Genetic Analyzer, Applied

Biosystems). Os dados de saídas foram coletados utilizando o programa Data Collection versão 2.0 (Applied Biosystems) e analisados usando programa GeneMapper versão 4.1 (Applied Biosystems) para a chamada dos alelos em pares de base.

Análise genética

Para determinar o conteúdo de informação genética dos marcadores SSRs que compõem os três painéis montados, foi realizada uma análise genética individual de 48 cultivares de feijoeiro comum desenvolvidas por instituições de pesquisa do Brasil e do exterior mantidas no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão. Utilizando os programas Cervus (KALINOWSKI et al., 2007) e FSTAT (GOUDET, 2002) os SSRs foram caracterizados quanto ao número e frequência dos alelos, seguido pela determinação das estimativas de heterozigidade esperada (H_E) e observada (H_O), índice de fixação (F_{IS}), probabilidade de identidade (PI) e poder de exclusão (PE).

Resultados e discussões

Atualmente, uma grande diversidade de procedimentos de extração de DNA estão descritos na literatura, muitos deles derivados de protocolos bem estabelecidos e que foram adaptados visando melhor adequação às ações de pesquisa em desenvolvimento. O procedimento

de extração de DNA baseado na coleta com a ferramenta “puncher” e adição do tampão de lise sem a necessidade de maceração do tecido vegetal e procedimentos adicionais mostrou-se adequada para ser adotado na rotina do laboratório de biotecnologia e condução dos trabalhos subsequentes. Uma das vantagens que esse procedimento oferece é a possibilidade de coletar e armazenar o tecido vegetal diretamente na placa de PCR, ou microtubos. Tal procedimento minimiza o tempo e custos demandados no decorrer do experimento, facilitando e acelerando a etapa de extração de DNA, pois os tampões podem ser adicionados diretamente nestes recipientes, evitando os procedimentos de pesagem, corte e disposição dos tecidos vegetais nos microtubos.

É importante destacar que o método de extração de DNA alcalina proposto mostrou-se satisfatório quanto à facilidade de uso, rapidez na extração e qualidade da amplificação do DNA, com eficiência de amplificação $\geq 94\%$, valor similar aos 95% obtidos por Xin et al. (2003). Adicionalmente, o DNA obtido ao final foi em quantidade e qualidade adequadas para a realização da PCR utilizando locos SSRs e detecção semi-automatizada, produzindo resultados similares ao obtidos com o DNA derivado do método de CTAB 2% (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), conforme ilustrado na Figura 2.

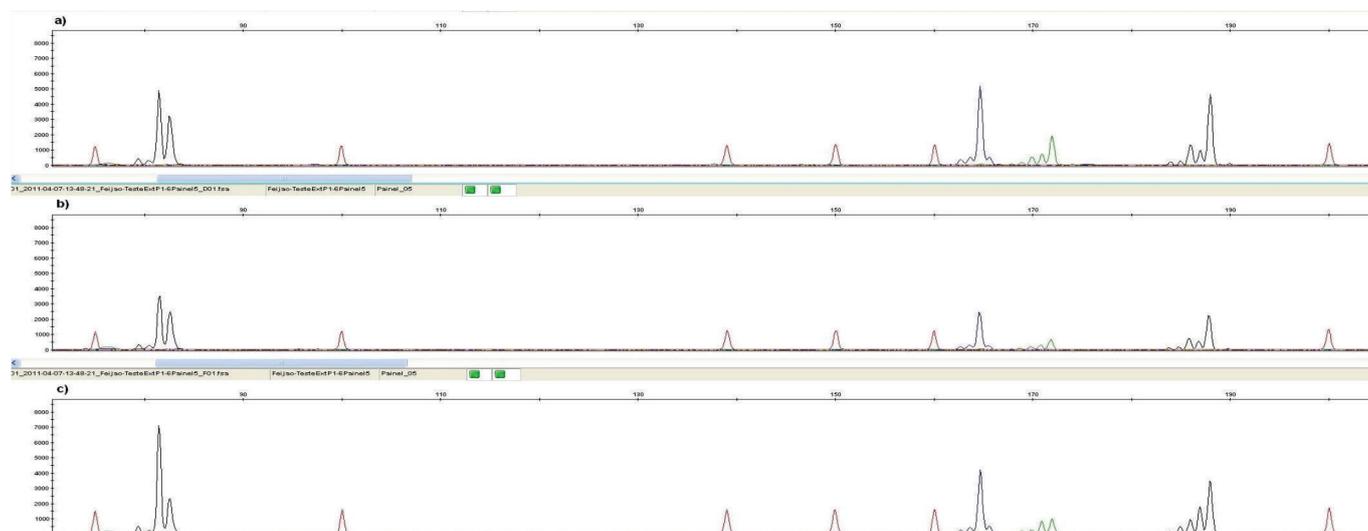


Figura 2. Perfil de amplificação simultânea de quatro locos SSRs para mesma amostra de feijoeiro comum, comparando métodos de extração e número de plantas por análise: **a)** extração alcalina a partir de dois discos foliares; **b)** extração alcalina com amostras em bulk contendo dez discos foliares; **c)** extração pelo método CTAB 2%, em bulk, a partir de dez discos foliares.

Entretanto, esse procedimento, quando comparado com o método de CTAB 2%, produz um DNA com menor grau de pureza e qualidade, o que pode comprometer a integridade e a qualidade das amostras quando armazenadas e conservadas por longos períodos de tempo. Segundo Xin et al. (2003), o DNA extraído pelo método alcalino pode ser preservado, quando armazenado a 4 °C, por até um mês e, a -20 °C, por até três meses, contudo avaliações preliminares realizadas no laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão utilizando amostras armazenadas a -20 °C por seis meses revelaram que as mesmas estavam adequadas para uso em reações de PCR. Adicionalmente, tal procedimento não utiliza reagentes tóxicos, como clorofórmio e fenol, e possuem um custo reduzido de R\$ 0,40 por amostra. Considerando a necessidade premente de estabelecimento de uma rotina de seleção assistida por marcadores no âmbito do programa de melhoramento da Embrapa, o protocolo mostrou ser adequado e viável para o feijoeiro comum. Além disso, o procedimento foi avaliado e também apresentou resultados satisfatórios para arroz e algodão a partir da extração de DNA de folhas e de sementes, demonstrando um amplo potencial de utilização para diferentes culturas, além daquelas avaliadas por Xin et al. (2003), que incluíram tabaco, sorgo e pinheiro.

Cada sistema de genotipagem foi composto por oito SSRs resultando na amplificação simultânea, rápida e eficiente dos 24 SSRs, implicando em redução de custos e tempo para a realização das análises. Ao todo foram identificados 240 alelos, com média de 10 alelos por loco gênico e diversidade gênica média de 0.79. A probabilidade de identidade combinada foi da ordem de $1,06 \times 10^{-23}$ e poder de exclusão de 0,99999, conforme detalhadamente descrito na Tabela 2.

Conclusões

O procedimento de extração de DNA baseado na coleta com a ferramenta “puncher” e lise alcalina é recomendado para ser utilizado na rotina das atividades de genotipagem molecular no âmbito do programa de melhoramento genético do feijoeiro comum.

O conjunto de 24 SSRs reunidos em três sistemas de genotipagem octaplex e com elevada diversidade gênica constitui ferramenta molecular efetivamente operacional para a caracterização e discriminação individual de acessos de feijoeiro comum.

Tabela 2. Parâmetros de descrição dos locos SSRs componentes dos três sistemas de genotipagem utilizados para feijoeiro comum. Número de alelos (**A**), frequência alélica (**F_{máx}**), heterozigotidade esperada (**He**) e observada (**Ho**), índice de fixação (**F_{is}**), probabilidade de identidade (**PI**) e poder de exclusão (**PE**).

Marcadores	A	F _{máx}	He	Ho	F _{is}	PI	PE
BM113	7	48,84	0,725	0,093	0,872	0,166	0,509
BM114	8	58,82	0,631	0,000	1,000	0,239	0,407
BM143	13	30,68	0,854	0,091	0,894	0,077	0,686
BM154	18	10,81	0,943	0,027	0,971	0,024	0,834
BM165	6	39,13	0,705	0,000	1,000	0,258	0,441
BM183	9	32,22	0,830	0,022	0,973	0,102	0,640
BM185	10	31,82	0,796	0,091	0,886	0,141	0,582
BM187	14	29,73	0,887	0,054	0,939	0,050	0,741
BM189	7	40,43	0,771	0,021	0,972	0,153	0,551
BM201	6	40,74	0,789	0,000	1,000	0,144	0,561
BM202	4	46,25	0,660	0,025	0,962	0,324	0,375
BM210	13	32,95	0,846	0,045	0,946	0,080	0,676
PV013	8	27,17	0,845	0,022	0,974	0,095	0,659
PV163	18	34,88	0,863	0,047	0,946	0,053	0,719
PV243	12	20,69	0,908	0,069	0,924	0,050	0,756
PV025	15	17,39	0,917	0,022	0,976	0,036	0,795
PV272	16	16,67	0,919	0,119	0,870	0,036	0,796
PV035	13	27,27	0,857	0,045	0,947	0,082	0,683
PV005	7	24,44	0,849	0,022	0,974	0,094	0,663
PV087	12	62,50	0,604	0,023	0,962	0,212	0,412
PV-ESTBR-006	12	25,00	0,863	0,087	0,899	0,074	0,698
PV-ESTBR-010	4	40,48	0,688	0,000	1,000	0,310	0,389
PV-ESTBR-101	4	70,37	0,470	0,000	1,000	0,455	0,232
PV-ESTBR-176	4	30,00	0,800	0,000	1,000	0,240	0,461
Média	10	34,97	0,793	0,039	0,951	-	-
Total	240	-	-	-	-	$1,06 \times 10^{-23}$	0,99999

Referências

- ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 4, p. 333-342, jul./ago. 2005.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C. Germoplasma: base para a nova agricultura. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 207, p. 70-73, ago. 2004.
- BUSO, G. S. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. P. V.; FERREIRA, M. E. Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 252-254, Mar. 2006.
- CHEDIAK, G. L. de C.; BRONDANI, R. P. V.; DEL PELOSO, M. J.; MELO, L. C.; BRONDANI, C. **Análise de pureza genética de sementes de feijoeiro comum utilizando marcadores microssatélites em sistema de genotipagem multiplex**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2007. 20 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 28).
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).
- GAITÁN-SOLÍS, E.; DUQUE, M. C.; EDWARDS, K. J.; TOHME, J. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 2128-2136, Nov./Dec. 2002.
- GARCIA, R. A. V.; RANGEL, P. N.; BRONDANI, C.; MARTINS, W. S.; MELO, L. C.; CARNEIRO, M. S.; BORBA, T. C. O.; BRONDANI, R. P. V. The characterization of a new set of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers as a resource for the genetic analysis of *Phaseolus vulgaris*. **BMC Genetics**, v.12, n. 41, p. 1-14, 2011.
- GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2) Feb. 2002. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 10 jul. 2011.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v.16, n. 5, p. 1099-1006, Mar. 2007.
- OLIVEIRA, L. K.; MELO, L. C.; BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V. Backcross assisted by microsatellite markers in common bean. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 4, p. 1000-1010, 2008.
- VALLONE, P. M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**, Natick, v. 37, n. 2, p. 226-231, Aug. 2004.
- VIANELLO-BRONDANI, R. P.; CARDOSO, P. C. B.; VEIGA, M. M.; MENEZES, I. P. P.; VALDISSER, P. A. M. R.; BORBA, T. C. O.; MELO, L. C.; DEL PELOSO, M. J.; BRONDANI, C. Molecular characterization of high performance inbred lines of Brazilian common beans. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, 2013.
- XIN, Z.; VELTEN, J.; OLIVER, M. J.; BURKE, J. J. High-throughput DNA extraction method suitable for PCR. **Biotechniques**, Natick, v. 34, n. 4, p. 820-826, Apr. 2003.

Comunicado Técnico, 208



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Arroz e Feijão
Endereço: Rod. GO 462, Km 12, Zona Rural, Caixa Postal 179, 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (62) 3533 2123
Fax: (62) 3533 2100
E-mail: sac.cnpaf@embrapa.br
1ª edição
 Versão online (2013)

Comitê de publicações

Presidente: Camilla Souza de Oliveira
Secretário-Executivo: Luiz Roberto R. da Silva
Membros: Flávia Aparecida de Alcântara, Luís Fernando Stone, Ana Lúcia Delalibera de Faria, Heloísa Célis Breseghello, Márcia Gonzaga de Castro Oliveira, Henrique César de Oliveira Ferreira.

Expediente

Supervisão editorial: Camilla Souza de Oliveira
Revisão de texto: Camilla Souza de Oliveira
Normalização bibliográfica: Ana Lúcia D. de Faria
Editoração eletrônica: Fabiano Severino