

Fatores de transcrição *bes1* em arroz: caracterização da regulação e expressão sob estresse por temperatura

Cássia Fernanda Stafen¹, Ana Marina Pedrolo², Vívian Ebeling Viana³, Camila Pegoraro⁴, Antônio Costa de Oliveira⁵

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo alimento mais consumido no mundo e é dependente das condições ambientais. Estas acabam intensificando os efeitos causados pelos estresses abióticos como frio e calor nas plantas. Faz-se então necessário entender os mecanismos moleculares que levam as plantas a crescerem em ambientes com condições críticas. O metabolismo vegetal é dependente da expressão de diferentes genes, os quais são regulados por fatores de transcrição. Fatores de transcrição regulam a expressão gênica através da ligação em elementos de regulação *cis* presentes nos promotores dos genes. Dentre os fatores de transcrição caracterizados em plantas destaca-se a família *BES1*. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de expressão de genes da família *BES1* em arroz sob condições de estresse por temperatura, assim como a regulação desses genes. Dessa forma, realizou-se uma busca para identificação de elementos *cis* na região promotora putativa dos genes *Os01g0203000*, *Os02g0233200*, *Os06g0552300* e *Os07g0580500* e analisou-se o perfil de expressão *in silico* desses genes em condições de estresse por frio e calor. Os resultados obtidos demonstraram que os elementos *cis* ABRE, CCAAT-box, CGTCA-motif e TGACG-motif estiveram presentes nos promotores dos quatro genes estudados, evidenciando a importância desses elementos *cis* na regulação da expressão de genes da família *BES1* em arroz. Com relação ao perfil de expressão, verificou-se que o estresse por frio induz a transcrição e, o estresse por calor inibe a transcrição desses genes. Esses resultados sugerem que os elementos *cis* comuns entre os genes podem ser responsáveis pela regulação transcricional dos genes *BES1* observada entre os estresses avaliados. No entanto, estudos mais aprofundados nos aspectos de regulação e expressão gênica são necessários para elucidar a regulação, assim como o papel desses genes na resposta a estresses abióticos.

¹ Bióloga - Mestranda em Fitomelhoramento da Universidade Federal de Pelotas.

² Engenheira Agrônoma - Mestranda em Fitomelhoramento da Universidade Federal de Pelotas.

³ Bióloga - Doutoranda em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

⁴ Professora da Universidade Federal de Pelotas.

⁵ Professor PhD da Universidade Federal de Pelotas.



PALAVRAS CHAVE

Oryza sativa, estresses abióticos, fatores de transcrição

***Bes1* transcription factors in rice: characterization of regulation and expression under temperature stress**

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is the second crop with higher consumption in the world and is dependent of environmental conditions, which intensify the effects caused by abiotic stresses such as cold and heat in plants. In front of this, it is necessary understand the molecular mechanisms that promote the plant growing in adverse environmental conditions. Plant metabolism is dependent of the expression of different genes, which are regulated by transcription factors. Transcription factors regulates the gene expression by binding *cis*-regulatory elements at gene promoters. Among the transcription factors of plants stands out the BES1 family. In this sense, the present study aimed to evaluate the expression profile of *BES1* gene family in rice under temperature stress as well as analyze the transcriptional regulation of these genes. A search of *cis*-regulatory elements in the putative promoter region of Os01g0203000, Os02g0233200, Os06g0552300 e Os07g0580500 was performed. Moreover, the *in silico* expression profile of these genes under cold and heat was also analyzed. The *cis*-regulatory elements ABRE, CCAAT-box, CGTCA-motif and TGACG-motif were found in all of the analyzed promoters. It demonstrates the need of these *cis*-regulatory elements during the gene expression regulation of the *BES1* family in rice. Regarding to the expression profile, an upregulation in cold stress and a downregulation in heat stress was observed. These results suggests that *cis*-regulatory elements that are common between the putative genes promoters can be involved in transcriptional regulation of *BES1* genes under the studied stresses. However, further analyzes should be performed respect to the gene regulation and expression are need to elucidate the regulation as well as the role of these genes in response to abiotic stresses.

KEYWORDS

Oryza sativa, abiotic stresses, transcription factors

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo alimento mais consumido no mundo (CONAB, 2016). Da mesma forma que ocorre nos demais cereais, o rendimento do arroz é dependente das condições ambientais (REYNOLDS et al., 2016).

As frequentes mudanças climáticas acabam intensificando os efeitos causados pelos estresses abióticos nas plantas, acarretando na diminuição da produtividade agrícola, conseqüente perda e impacto na economia. Dentre os estresses abióticos está o frio, que ocasiona danos ao crescimento e desenvolvimento das culturas, levando a perdas no rendimento das mesmas (BEVILACQUA, et al., 2015), e o estresse por calor, que em muitos locais onde o arroz é cultivado têm temperaturas que confinam limites críticos para uma produção de grãos ideal (PENG et al., 2004).

Para se adaptar e sobreviver em condições adversas as plantas desenvolvem diferentes mecanismos. O entendimento desses mecanismos pode embasar o desenvolvimento de genótipos tolerantes a estresses abióticos, seja através de ferramentas de engenharia genética, seja através de técnicas de melhoramento clássico direcionado (WILKINS et al., 2016).

A expressão e regulação gênica nos últimos anos está sendo extensivamente estudada, no entanto, os detalhes finos dessas redes regulatórias ainda são amplamente desconhecidos, e as questões sobre a forma como elas funcionam também carecem de informação (ZHOU et al., 2013). O entendimento da regulação gênica é fundamental para o desenvolvimento de novos genótipos. Dada a importância desse assunto, verifica-se que vários estudos de expressão e regulação gênica foram desenvolvidos recentemente, como é o caso da aveia (PACAK et al., 2016), soja (MARCOLINO-GOMES et al., 2014), algodão (PANDEY, e CHAUDHARY, 2016) e arroz (DEY, 2016).

Os fatores de transcrição são os protagonistas mais importantes nas redes regulatórias contidas nas respostas das plantas aos estresses abióticos (BALDONI et al., 2015). Estes regulam outros genes através da ligação de elementos de regulação *cis* nos promotores desses genes. Dentre os fatores de transcrição caracterizados em plantas, destaca-se o BRI1-EMS-SUPPRESSOR1 (*BES1*), os quais compreendem uma família de

fatores de transcrição encarregada de regular a expressão de genes que são alvos da resposta aos brassinosteróides (BR), estes por sua vez são um grupo de fitohormônios esteroides responsáveis por várias fases no processo de desenvolvimento vegetal e respostas das plantas à estresses bióticos e abióticos (JIANG et al., 2015).

Apesar do grande número de estudos visando relacionar diferentes famílias de fatores de transcrição com a resposta das plantas sob diferentes estresses, poucas pesquisas têm sido desenvolvidas com fatores de transcrição da família *BES1*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a regulação de genes da família *BES1* em arroz assim como o perfil de expressão desses genes sob condições de estresse por temperatura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Um grupo de seis genes da família *BES1* em arroz (*Oryza sativa* spp. japonica) foi identificado no banco de dados *Plant Transcription Factor Database* (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>). No entanto, para este estudo foram utilizados apenas quatro genes *BES1* que apresentavam dados de expressão gênica na plataforma *Genevestigator* (<https://genevestigator.com/gv/>) (ZIMMERMANN et al. 2008).

Identificaram-se elementos de regulação *cis* na região promotora putativa dos genes *Os01g0203000*, *Os02g0233200*, *Os06g0552300* e *Os07g0580500*. Para isso, as sequências correspondentes ao promotor (1,5 kb *upstream* do sítio de início da transcrição) de cada gene foram obtidas no banco de dados *The Rice Annotation Project* (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). A identificação de elementos de regulação *cis* na região promotora foi feita através da utilização do software *PlantCARE* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (LESCOT et al. 2002). Consideram-se apenas os elementos de regulação *cis* que apresentavam *Matrix score* ≥ 5 .

O perfil de expressão *in silico* dos genes *BES1* foi obtido no banco de dados *Genevestigator*, utilizando dados de expressão de plantas de arroz submetidas às condições de frio e calor. Para a condição de frio foi utilizada a cultivar Jumli Marshi (*O.*

sativa spp. japonica), a qual foi cultivada durante três semanas a 20°C seguido de 24 horas a 4°C. As condições de luminosidade foram as mesmas durante todo o período do experimento. Para a condição controle, as plantas permaneceram a 20°C. A análise de expressão gênica foi feita em folhas, utilizando a plataforma *Affymetrix GeneChip Rice Genome Array* (A-AFFY-126) (CHAWADE et al., 2013). Para a condição de calor foi utilizada a cultivar Zhonghua11 (*O. sativa* spp. japonica), a qual foi cultivada durante duas semanas a 28-30°C seguido de três horas a 42°C. As condições de luminosidade foram as mesmas durante todo o período do experimento. Para a condição controle, as plantas permaneceram a 28-30°C. A análise de expressão gênica foi feita em plântulas utilizando a plataforma *Affymetrix* (GSE14275) (HUA et al., 2009). Foram utilizados apenas dados de expressão com $p\text{-value} \leq 0.05$. Para a obtenção do *heatmap*, dados de expressão (Log2) foram exportados para o programa *MeV: MultiExperiment Viewer* (SAEED et al., 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após analisar a presença de elementos de regulação *cis* verificou-se que as regiões promotoras putativas de genes da família *BES1* em arroz da subespécie japonica, apresentaram diferentes elementos de regulação *cis*. Foi observada a presença do elementos de regulação *cis* ABRE nos quatro genes (*Os01g0203000*, *Os02g0233200*, *Os06g0552300* e *Os07g0580500*) avaliados. O elemento ABRE está envolvido no mecanismo de resposta ao ácido abscísico (ABA). Resultado similar foi observado para o elementos de regulação *cis* CCAAT-box, que também esteve presente na região promotora dos quatro genes *BES1*. O elemento CCAAT-box é um sítio de ligação do fator de transcrição da família MYB. Os elementos CGTCA-motif e TGACG-motif, que estão associados a resposta ao fitohormônio metil jasmonato (MeJA), também estiveram presentes nos quatro genes estudados (Figura 1).

Buscando verificar se os genes da família *BES1* estavam associados a resposta ao estresse por temperatura verificou-se a expressão desses genes em plantas de arroz submetidas ao estresse por frio e por calor. Com base nos resultados obtidos, verificou-se

que o estresse por frio induziu a transcrição e o estresse por calor, pelo contrário, inibiu a transcrição nos quatro genes (*Os01g0203000*, *Os02g0233200*, *Os06g0552300* e *Os07g0580500*) estudados (Figura 2). Esse resultado indica que os genes *BES1* avaliados nesse estudo estão envolvidos na resposta celular frente ao estresse ocasionado por frio.

XElementos de regulação <i>cis</i>	<i>Os01g0203000</i>	<i>Os02g0233200</i>	<i>Os06g0552300</i>	<i>Os07g0580500</i>
A-box	Red	Green	Red	Red
ABRE	Red	Red	Red	Red
AAGAA-motif	Green	Green	Red	Green
AC-II	Red	Red	Green	Green
ACE	Red	Green	Green	Green
ARE	Red	Red	Red	Red
AT-rich element	Red	Green	Green	Green
AT-rich sequence	Red	Green	Green	Green
AT1-motif	Red	Green	Green	Green
ATCT-motif	Green	Red	Green	Red
ATC-motif	Red	Red	Green	Red
ATGCAAT motif	Red	Green	Green	Green
AE-box	Green	Green	Red	Red
Box 4	Red	Green	Green	Green
Box I	Green	Red	Green	Green
Box II	Green	Green	Red	Green
Box III	Green	Red	Red	Green
Box-W1	Green	Green	Green	Green
CAAT-box	Red	Red	Red	Red
CAT-box	Red	Red	Red	Red
CATT-motif	Green	Red	Green	Green
CCAAT-box	Red	Red	Red	Red
CCGTCC-box	Red	Green	Red	Red
CE3	Red	Green	Green	Green
CGTCA-motif	Red	Red	Red	Red
ERE	Green	Red	Green	Green
G-Box	Red	Red	Red	Red
G-box	Red	Red	Red	Red
GARE-motif	Red	Green	Green	Red

Elementos de regulação <i>cis</i>	<i>Os01g0203000</i>	<i>Os02g0233200</i>	<i>Os06g0552300</i>	<i>Os07g0580500</i>
GATA-motif	Green	Green	Green	Red
HD-Zip 3	Green	Red	Green	Green
HSE	Red	Red	Green	Green
I-box	Green	Green	Red	Red
LTR	Green	Green	Red	Green
MBS	Red	Red	Green	Red
MNF1	Red	Red	Green	Green
MSA-like	Green	Red	Red	Green
O2-site	Red	Green	Green	Red
OCT	Green	Green	Red	Green
RY-element	Green	Green	Red	Red
Skn-1_motif	Red	Red	Red	Red
Sp1	Red	Red	Red	Green
TATA-box	Red	Red	Red	Red
TATC-box	Red	Green	Green	Green
TCCC-motif	Red	Green	Red	Green
TGA-element	Red	Red	Green	Green
TATCCAT/C-motif	Green	Red	Green	Green
TGACG-motif	Red	Red	Red	Red
Unnamed__1	Red	Red	Red	Red
Unnamed__2	Red	Green	Red	Green
Unnamed__6	Red	Red	Green	Green
Unnamed__10	Red	Green	Green	Green
Unnamed__11	Green	Red	Green	Green
Unnamed__14	Red	Green	Green	Green
Unnamed__17	Green	Red	Green	Green
box II	Red	Green	Red	Red
box S	Red	Green	Green	Red
dOCT	Green	Green	Red	Green

GAG-motif	Green	Green	Red	Green	W box	Green	Red	Red	Green
GA-motif	Green	Red	Green	Red	circadian	Green	Red	Green	Red
GC-motif	Red	Red	Red	Green	motif I	Green	Green	Red	Green
GCN4_motif	Red	Red	Green	Green	motif IIb	Green	Green	Red	Green
GT1-motif	Red	Red	Green	Red	plant_AP-2-like	Green	Green	Red	Green
GCC box	Green	Green	Red	Red	rbcS-CMA7a	Green	Green	Green	Red

Figura 1 – Elementos de regulação *cis* presentes na região promotora putativa (1.5kb) de genes da família *BES1* em *Oryza sativa* L. spp japonica. A cor verde representa a ausência do elementos de regulação *cis* e a cor vermelha representa presença do elementos de regulação *cis*. Os elementos de regulação *cis* foram identificados utilizando o programa PlantCARE.

O ABA é um fitohormônio que desempenha um papel fundamental nos diferentes estádios fisiológicos e de desenvolvimento do arroz. Durante a fase vegetativa, o ABA desempenha um papel fundamental na sinalização de resposta a vários estresses ambientais como a salinidade, a seca e o frio. Genes regulados por ABA apresentam na sua região promotora elementos de regulação *cis* responsivos ao ABA (ABRE) (BASU et al., 2014). Dessa forma, sugere-se que a presença do elemento ABRE no promotor dos genes *BES1* esteja associada à indução da transcrição desses genes em condições de frio.

De forma similar ao ABA, o MeJA é fundamental durante todos os estádios de desenvolvimento das plantas, além disso esse fitohormônio ativa os mecanismos de defesa da planta em resposta ao ataque de insetos, patógenos e estresse ambiental como baixas temperaturas, salinidade, toxidade e metais pesados (SHARMA e ASHVERYA, 2015). Um estudo desenvolvido por Pedrazani et al. (2007) tem demonstrado que o estresse por frio pode levar ao aumento do conteúdo de MeJA. Nesse sentido, acredita-se que os elementos de regulação *cis* CGTCA-motif e TGACG-motif, associados a sinalização de MeJA, também sejam responsáveis pela ativação da transcrição dos genes *BES1* em condições de estresse por frio.

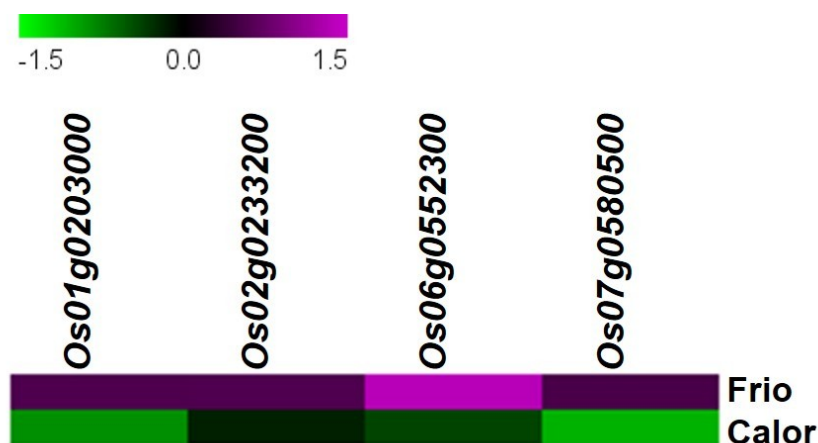


Figura 2 – Perfil de expressão de genes da família *BES1* em *Oryza sativa* L. spp japônica sob condições de estresse por frio e calor. Cor verde representa inibição da transcrição, cor preta representa a não alteração da transcrição e cor rosa representa indução da transcrição. Os dados de expressão representados em Log₂, foram extraídos do programa Geneinvestigator (Zimmermann et al., 2008) e analisados no programa MeV (Saeed et al., 2003).

Fatores de transcrição MYB são induzidos pelo frio, e se ligam na região de outros genes regulando a expressão dos mesmos (AGARWAL et al., 2006). Essa informação evidencia que plantas de arroz submetidas a baixas temperaturas induzem a expressão de FTs MYBs, os quais podem se ligar no elemento de regulação *cis* CCAAT-box de genes *BES1*, aumentando a expressão desses genes.

De maneira geral, esse estudo possibilitou obter informações básicas da regulação de genes *BES1*, uma família de fatores de transcrição pouco estudada em arroz. Com base nos resultados obtidos acredita-se que os elementos de regulação *cis* ABRE, CCAAT-box, CGTCA-motif e TGACG-motif são responsáveis pela regulação da transcrição de genes *BES1* em arroz sob condições de estresse por frio. No entanto,



sugere-se a validação dos resultados aqui obtidos através do desenvolvimento de estudos mais aprofundados de expressão gênica e de elementos reguladores.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os elementos de regulação *cis* ABRE, CCAAT-box, CGTCA-motif e TGACG-motif parecem regular a expressão de genes da família BES1 (*Os01g0203000*, *Os02g0233200*, *Os06g0552300* e *Os07g0580500*) em arroz sob condições de estresse por frio.

5 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; HAO, Y.; KAPOOR, A.; DONG, C-H.; FUJII, H.; ZHENG, X.; ZHU, J-K. A R2R3 Type MYB Transcription Factor Is Involved in the Cold Regulation of CBF Genes and in Acquired Freezing Tolerance. **The journal of biological chemistry**, v. 281, p.37636-37645, 2006.
- BALDONI, E.; GENGA, A.; COMINELLI, E. Plant MYB Transcription Factors: Their Role in Drought Response Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16(7), p.15811-15851, 2015.
- BASU, S.; ROYCHOUDHURY, A.; [SENGUPTA](#), D. N. Deciphering the Role of various *cis*-acting regulatory elements in controlling SamDC gene expression in Rice. **Plant Signal Behav**, v.9, p.1-5, 2014.
- BEVILACQUA, C. B.; BSU, S.; PEREIRA, A.; TSENG, T.-M.; ZIMMER, P. D.; BURGOS, N. R. Analysis of Stress-Responsive Gene Expression in Cultivated and Weedy Rice Differing in Cold Stress Tolerance. **PLoS ONE**, v. 10(7), p. 1-22, 2015.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento. Perspectiva na Agropecuária. Volume 4; Safra 2016/2017**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_13_09_06_46_perspectivas_da_agropecuaria_2016-17_digital.pdf. Acesso em: 16 de agosto de 2017



CHAWADE, A.; LINDLÖF, A.; OLSSON, B.; OLSSON O. Global expression profiling of low temperature induced genes in the chilling tolerant japonica rice jumli marshi. *PLoS One*, v.8(12), p.1-15, 2013.

DEY, A.; SAMANTA, M. K.; GAYEN, S.; SEN, S. K.; MAITI, M. K. Enhanced Gene Expression Rather than Natural Polymorphism in Coding Sequence of the *OsZIP23* Determines Drought Tolerance and Yield Improvement in Rice Genotypes. **PLoS ONE**, v.11(3), p.1-26, 2016.

Hua, W.; Hua, G.; Hana, B. Genome wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. **Plant Science**. v.176(4), p.583-590, 2009.

JIANG, J.; ZHANG, C.; WANG, X. A Recently Evolved Isoform of the Transcription Factor BES1 Promotes Brassinosteroid Signaling and Development in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v.27(2), p.361-374, 2015.

LESCOT, M.; DÉHAIS, P.; THIJS, G.; MARCHAL, K.; MOREAU, Y.; VAN DE PEER, Y.; ... ROMBAUTS, S. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. **Nucleic Acids Research**, v.30(1), p.325–327, 2002.

MARCOLINO-GOMES, J.; RODRIGUES, F. A.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; BENDIX, C.; NAKAYAMA, T. J.; CELAYA, B.; MOLINARI, H. B. C.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; HARMON, F. G.; NEPOMUCENO, A. Diurnal Oscillations of Soybean Circadian Clock and Drought Responsive Genes. **PLoS ONE**, v.9(1), p.1-13, 2014.

PACAK, A.; BARCISZEWSKA-PACAK, M.; SWIDA-BARTECZKA, A.; KRUSZKA, K.; SEGA, P.; MILANOWSKA, K.; JAKOBSEN, I.; JARMOLOWSKI, A.; SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z. Heat Stress Affects Pi-related Genes Expression and Inorganic Phosphate Deposition/Accumulation in Barley. **Frontiers in Plant Science**, v.7:926, p.1-19, 2016.

PANDEY, D. K.; CHAUDHARY, B. Domestication-driven *Gossypium* profilin 1 (*GhPRF1*) gene transduces early flowering phenotype in tobacco by spatial alteration of apical/floral-meristem related gene expression. **BMC Plant Biology**, v.16, p.1-21, 2016.



PENG S, et al. Rice yields decline with higher night temperature from global warming. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. v. 101(27), p.9971-9975, 2004.

PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences.

PEDRANZANI, H.; SIERRA-DE-GRADO, R.; VIGLIOCCO, A.; MIERSCH, O.; ABDALA, G. Cold and water stresses produce changes in endogenous jasmonates in two populations of *Pinus pinaster* Ait. **Plant Growth Regulation**, v.52, p.111-116, 2007.

REYNOLDS, M.P. et al. An integrated approach to maintaining cereal productivity under climate change. **Global Food Security**, v. 8, p.9-18, 2016.

SAEED, A.I et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**. v. 34, n. 2, p.374-378. 2003.

WILKINS, O.; HAFEMEISTER, C.; PLESSIS, A.; HOLLOWAY-PHILLIPS, M.-M.; PHAM, G. M.; NICOTRA, A. B; GREGORIO G. B.; JAGADISH, S.V., K.; SEPTININGSIH, E.M.; BONNEAU, B.; PURUGGANAN, M. EGRINs (Environmental Gene Regulatory Influence Networks) in Rice That Function in the Response to Water Deficit, High Temperature, and Agricultural Environments. **The Plant Cell**, v.28(10), p.2365–2384, 2016

ZIMMERMANN, P.; LAULE, O.; SCHMITZ, J.; HRUZ, T.; BLEULER, S.; GRUISSEM, W. Genevestigator transcriptome meta-analysis and biomarker search using rice and barley gene expression databases. **Molecular Plant**, v.1, p.851-857. 2008.

ZHOU, M.; LI, D.; LI, Z.; HU, Q.; YANG, C.; ZHU, L.; LUO, H. Constitutive Expression of a *miR319* Gene Alters Plant Development and Enhances Salt and Drought Tolerance in Transgenic Creeping Bentgrass. **Plant Physiology**, v. 161(3), p.1375-1391, 2013.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não possuir nenhum tipo de conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação Estadual de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

C.F.S. análises; C.F.S., A.M.P., V.E.V. e C.P. interpretação e escrita do trabalho; C.P., A.C.O. concebeu o estudo e supervisionou a pesquisa.