

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE CERCÁRIAS DE *Schistosoma mansoni* AO
LÁTEX DE *Euphorbia milii* var. *hislopilii* NO DESENVOLVIMENTO DAS
FORMAS ADULTAS NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO**

RONALDO DE CARVALHO AUGUSTO

RIO DE JANEIRO

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A923 Augusto, Ronaldo de Carvalho

Efeito da exposição de cercarias de *Schistosoma mansoni* ao látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii* no desenvolvimento das formas adultas no hospedeiro definitivo / Ronaldo de Carvalho Augusto. – Rio de Janeiro, 2016.

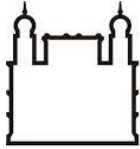
xiv, 157 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 67-82

1. Esquistossomose. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Moluscicida. 4. *Euphorbia milii*. 5. Ultraestrutura. 6. Proteômica. 7. Microscopia eletrônica de varredura. 8. MEV-EDS. 9. Interação gênica. I. Título.

CDD 616.963



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz

RONALDO DE CARVALHO AUGUSTO

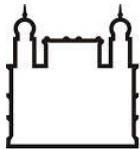
**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE CERCÁRIAS DE *Schistosoma mansoni* AO
LÁTEX DE *Euphorbia milii* var. *hislopii* NO DESENVOLVIMENTO DAS
FORMAS ADULTAS NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência.

Orientadora: Dra. Claudia Portes Santos

RIO DE JANEIRO

2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz

RONALDO DE CARVALHO AUGUSTO

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE CERCÁRIAS DE *Schistosoma mansoni* AO
LÁTEX DE *Euphorbia milii* var. *hislopii* NO DESENVOLVIMENTO DAS
FORMAS ADULTAS NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO**

ORIENTADORA: Dra. Claudia Portes Santos

Aprovada em: 23/05/2016

EXAMINADORES:

Dr. Carlos Roberto Alves

Dr. Arnaldo Maldonado Jr.

Dr. Claudio Lisias Mafra de Siqueira

Dr. Jairo Pinheiro

Dr. Maurício Carvalho de Vasconcellos

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ronaldo da Costa Augusto e Moema José de Carvalho Augusto, pela profunda dedicação na formação e na educação minha e de meus irmãos. Levo no peito os mais belos ensinamentos emanados por vocês cotidianamente: amor, compreensão e união. Muito obrigado pela paciência ao longo destes longos anos de formação acadêmico-científica. Obrigado pela formação moral, ideológica e política ensinada à duras penas. Muito obrigado por tudo.

À minha avó Maria, “vó Dinda”, Maria dos gatos, Wanda, Ruth ou seja lá quais mais alcunhas poderá ter. Obrigado pelo apoio e incentivo a toda hora. A você que não poderia prever que a esquistossomose de sua infância seria o tema norteador da vida do neto caçula.

Aos meus irmãos, Pedro e Leonardo, pela irmandade no mais amplo sentido da palavra. Sem vocês essa caminhada seria muitíssimo mais complexa, e sem dúvidas, mais sem graça também! Às Cunhas pelo apoio e pelos melhores presentes do mundo: Bia e Flora!

À Larisse Swinerd, amor da vida, companheira e incentivadora incansável. Por estar presente em todas as etapas dessa caminhada. Muito obrigado!

Aos amigos do Laboratório de Esquistossomose Experimental (LEE) pela disponibilidade e auxílio ao longo destes anos que vem desde minha iniciação científica. Em especial à Eliane, Sorriso e Tatiane, à Dra Patricia Machado, Dra Mônica Villar, Dr. Geraldo Armoa e Dra Mirian Tendler.

Aos amigos do NuBioMol (UFV - Viçosa) Edvaldo Barros, Cynthia Mantovani, Rafael, Nivea, Dr. Humberto Ramos, Dr. Claudio Mafra, entre outros, pelos ensinamentos e auxílios nas mais variadas etapas da tese; e aos amigos da República da Luz Vermelha e Felipe Tchê, muito obrigado pela amizade e companheirismo.

Un grand remerciement à tous mes amis qui m’ont épaulé et aidé pendant la période que j’ai passé au Laboratoire Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements: Benjamin Gourbal, Jerome Boissier, Céline Cosseau, David Duval, Richard Galinier, Silvain Pinaud et Anais Portet, Benoît Aliaga, Rodolfo Rondon, Annia Alba et Nele Boon. Je voudrai exprimer ma gratitude tout particulièrement a Mariana Gomes Lima, Cristian Chaparro, Marion Picard, Guillaume Tetreau et David Roquis.

Christoph Grunau pour la réceptivité, l'orientation et l'inspiration dans le domaine scientifique et personnel. *Des chercheurs comme vous et toute votre équipe peuvent changer le monde!*

À família Franco-Chilena-Brasileira de Cristian Chaparro, Carmen Lara e das meninas Gabi e Maria Paula pela graciosa acolhida em Perpignan e Banyuls-Sur-Mer.

Aos pesquisadores e amigos do LAPSA, em especial à Juliana, Everton, Felipe Gullo, Karina, Viviane, Claudiane, Aline, Carol, Pedro, Vanessa, Anna Carla e Gabrielapelo suporte, companheirismo e risadas ao longo destes quatro anos.

À Dra. Clélia C Mello-Silva, Fiocruz-RJ, pela amizade e condução na caminhada científica desde os tempos de faculdade. Com você aprendi que a pesquisa vai além da bancada, e que por trás de todo experimento, há uma doença que precisa ser combatida.

À Dra. Claudia Portes, Fiocruz-RJ, por ter aceitado o desafio da orientação, pelas oportunidades e ensinamentos ao longo de toda esta etapa.

Ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária e à Fiocruz pelas oportunidades singulares e pela honra e prazer de cruzar cotidianamente com grandes mestres como Dr. Luís Rey, Dr. Leonel Lenzi, Dr. Lobato Paraense, Dr. José Coura, Dr. Luís Fernando Ferreira, entre muitos outros. Tem sido um grande prazer amadurecer em Manguinhos.

Às agências de financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES Parasitologia Básica/2011), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa no Rio de Janeiro (FAPERJ-BIOTA 2012), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) – Edital Universal 2014, PAEF/Fiocruz e ao Programa Ciências sem Fronteiras, Doutorado Sanduiche, modalidade SWE (205872/2014-0).

À Deus por ter possibilitado todos esses contatos ao longo da trajetória.

RESUMO

A pesquisa sobre compostos naturais que possam auxiliar no controle da esquistossomose estão definidos no Plano Estratégico da Organização Mundial da Saúde, sendo o Instituto Oswaldo Cruz pioneiro em estudos com o látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii* como moluscicida. A proposta deste trabalho foi estudar os efeitos que as cercárias de *Schistosoma mansoni* expostas à concentração subletal do látex induziram no desenvolvimento e dinâmica parasitária de adultos em condições experimentais. Foram avaliadas a taxa de recuperação de vermes adultos e o número de ovos postos pelas fêmeas. As alterações no tegumento foram estudadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As diferenças na expressão proteica dos adultos foram analisadas por eletroforese bidimensional e sua identificação feita por MALDI TOF-TOF. Adicionalmente a composição de elementos químicos presentes no látex e nos grupos controle e exposto foram avaliados por MEV associada a um Detector de Espectrometria de Energia Dispersiva. Após a exposição foi observada redução no desenvolvimento de parasitos machos e fêmeas em 71,7% e 74,4%, respectivamente. Fatores ecológicos como a taxa de infecção, proporção sexual e a atividade reprodutiva foram significativamente alterados. O tegumento dos adultos sofreu alterações morfológicas, sendo observada pela primeira vez a ausência total de espinhos no canal ginecóforo. O látex apresentou composição de 12 elementos químicos incluindo Al, Pt, Hg e Rh; no tegumento de machos do grupo tratado, Na, K e Mg divergiram estatisticamente de seus controles. A análise proteômica de machos adultos detectou 26 *spots* diferencialmente expressos, sendo sete proteínas identificadas e validadas estatística e manualmente (Actina, Troponina T, Tropomiosina, Paramiosina, hsp70, 14-3-3 epsilon e Aldeído Desidrogenase). As mudanças drásticas no perfil proteômico de parasitos oriundos de cercárias expostas ao látex de *E. milii* pode ter induzido uma fragilidade muscular significativa no corpo de machos adultos de *S. mansoni*, com a consequente redução na atividade reprodutiva e carga parasitária como observados no presente estudo. Este estudo traz uma nova visão para o controle da esquistossomose em áreas endêmicas usando produtos naturais para reduzir a carga parasitária no hospedeiro definitivo. Esta abordagem apresenta baixo custo, é ecológica, eficiente e poderá auxiliar a terapia por anti-helmínticos preconizada pela OMS, utilizando o látex de *Euphorbia milii* como moluscicida, mas também como esquistossomostático.

ABSTRACT

The research of natural compounds that may help to control the schistosomiasis are stated in the Strategic Plan of the World Health Organization and, the Oswaldo Cruz Institute is a pioneer on the studies with the *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex as molluscicide. The present work aimed to study the effects that *Schistosoma mansoni* cercariae exposed to a sublethal concentration the latex induced in the development and parasite dynamics of adults under experimental conditions. The recovery rate of adult worms and the number of eggs laid by the females were evaluated. The changes in the tegument were studied by scanning electron microscopy (SEM). The differences in the protein expression of adults were analyzed by two-dimensional electrophoresis and its identification was performed using a MALDI TOF-TOF. In addition, the elemental composition of the latex, control and exposed groups were evaluated by SEM, associated with an Energy Dispersive Detector. After the exposure, a reduction in the development of males and females parasites in 71.7% and 74.4%, respectively, were observed. Ecological factors such as infection rate, sex ratio and reproductive activity were significantly altered. The tegument of adults had morphological changes, being observed for the first time the complete absence of spines in the gynaecophoric channel. The latex presented a composition of 12 chemical elements including Al, Pt, Hg and Rh; the tegument of males from treated group, Na, K and Mg differed statistically to controls. The proteomic analysis of adult males detected 26 differentially expressed spots, seven proteins were identified and manually and statistically validated (Actin, Troponin T, Tropomyosin, Paramyosin, hsp70, 14-3-3 epsilon and Aldehyde dehydrogenase). The drastic changes in the proteomic profile on parasites from exposed cercariae to *E. milii* latex may have induced significant muscle weakness in the body of adult males of *S. mansoni*, with the consequent reduction in reproductive activity and parasite load as observed in this study. This study carries a new vision for the control of schistosomiasis in endemic areas using natural products to reduce the parasite load in the definitive host. This indirect therapy is low costs, ecological, efficient and may help in the future the control in association with anthelmintic therapy currently recommended by WHO, using the *Euphorbia milii* latex as molluscicidal but also as schistosomostatic.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
O Parasito	1
1.2. Esquistossomose mansônica	8
1.3. O látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i>	13
JUSTIFICATIVA	17
OBJETIVOS	18
Objetivos específicos	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
Desenho Experimental	19
Coleta, liofilização e cálculo da dose letal (DL ₉₀) e subletal (DL ₅₀) do látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>Hislopii</i>	21
4.3. Manutenção dos moluscos em laboratório e infecção do hospedeiro intermediário	21
4.4. Manutenção de camundongos e infecção do hospedeiro definitivo	22
4.5. Análises Parasitológicas e Ecológicas	24
4.6. Análise de Ultraestrutura	24
4.6.1. Microscopia Eletrônica de Varredura associada a um Detector de Espectrometria de Energia Dispersiva (MEV-EDS)	25
4.7. Análise Proteômica	25
4.7.1. Extração, Quantificação de Proteínas Totais de <i>S. mansoni</i> e Eletroforese Bidimensional	25
4.7.2. Excisão, Tripsinólise e Espectrometria de Massas	26
4.8. Extração de RNA e Quantificação do gene 18S rRNA	28
4.9. Análises estatísticas	29
RESULTADOS	30
5.1. Análises Parasitológicas e Ecológicas	30
5.2. Análises ultraestruturais	33
5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura associada a um Detector de Espectrometria de Energia Dispersiva (MEV-EDS)	37
5.3. Análise Proteômica	40

5.4. Quantificação do gene 18S rRNA	50
DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	83

Lista de Figuras

- Figura 1: Ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Adaptado de Roquis (2015). 3
- Figuras 2-6: Estágios evolutivos de *Schistosoma mansoni*. Figura 2: Ovo. Figura 3: Miracídio. Figura 4: Cercária. Figura 5: Esquistossômulo. Figura 6: Casal parasitário. 7
- Figura 7: Prevalência predita entre 2005-2009 para esquistossomose no Brasil. Figura 8: Casos de esquistossomose confirmados no Brasil entre o período de janeiro de 1995 a dezembro de 2015. 10
- Figura 9: Esquematização do desenho experimental utilizado. 20
- Figura 10: *Euphorbia milii* var. *hislopii*. Figura 11: Exemplar de *Biomphalaria glabrata* durante processo de infecção por *Schistosoma mansoni*. Figura 12: Exemplar de *Mus musculus* durante processo de infecção por *S. mansoni*. Figura 13: Microisoladores contendo *M. musculus* infectados por *S. mansoni* no biotério do Pavilhão Cardoso Fontes. 23
- Figura 14: Taxa de infecção de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. Figuras 15-16: Relação entre a proporção sexual (parasitos machos/parasitos fêmeas) com a carga parasitária de *S. mansoni* em camundongo Swiss Webster experimentalmente infectado. Figura 15: Regressão linear em espécimes do grupo 1. Figura 16: Regressão linear em espécimes do grupo 2. Figura 17: Atividade reprodutiva de fêmeas de *S. mansoni*. 31
- Figuras 18-23: Microscopia eletrônica de varredura de fêmeas de *Schistosoma mansoni*. Figura 18: Formação de padrão de ventosas oral e 34

ventrais do parasita controle (barra = 20 mm). Figura 19: Rugas no tegumento do parasita adulto na região anterior formado a partir de cercárias expostas ao látex de *Euphorbia milii* (barra = 50 mm). Figura 20: Seção mediana de fêmeas do grupo controle (barra = 50 µm). Figura 21: Seção mediana de fêmeas adultas oriundas de cercárias expostas ao látex de *E. milii* (barra=50 µm). Figura 22: Seção posterior de fêmeas do grupo controle (barra = 20 µm). Figura 23: Seção posterior de fêmeas adultas oriundas de cercárias expostas ao látex de *E. milii* (barra = 10 µm).

Figuras 24-28: Microscopia eletrônica de varredura de *Schistosoma mansoni*. 35
Figura 24: Casal Parasitário formado por macho e fêmea (barra= 500 µm). Figura 25: Seção anterior de machos do grupo controle (barra = 20 µm). Figura 26: Seção anterior de machos adultos oriundas de cercárias expostos ao látex de *Euphorbia milii* (barra = 100 µm). Figura 27: Seção mediana de parasitos machos do grupo controle (Grupo 1) (barra = 50 µm). Figura 28: Seção mediana de parasitos machos tratados (Grupo 2) (barra = 50 µm).

Figuras 29-34: Microscopia eletrônica de varredura de machos de 36
Schistosoma mansoni. Figura 29: Tegumento dorsal de parasitos do grupo controle (barra = 10 µm). Figura 30: Seção dorsal do tegumento de parasitos oriundos de cercárias expostas ao látex de *Euphorbia milii* (barra = 5 µm). Figura 31: Tubérculos de parasitos do grupo controle (barra = 10 µm). Figura 32: Tegumento na seção dorsal de machos adultos oriundos de cercárias expostas ao látex de *E. milii* (barra = 5 µm). Figura 33: Interior do canal ginecóforo de parasitos do grupo controle (barra = 2 µm). Figura 34: Interior do canal ginecóforo de parasitos oriundos de cercárias expostas ao látex de *E. milii* (barra = 10 µm).

Figuras 35-38: Ultraestrutura do látex liofilizado de *Euphorbia milii* var. 38
hislopii e morfologia do tegumento de *Schistosoma mansoni* adulto. 35. Látex liofilizado de *E. milii*. 36. Tegumento de adulto macho de *S. mansoni*

do grupo controle. 37-38. Tegumento de macho adulto de *S. mansoni* exposto ao látex de *E. milii* na fase cercarial, mostrando intenso dano à superfície externa.

Figuras 39 e 40: Eletroforese bidimensional de machos adultos de *Schistosoma mansoni* realizada em fitas de sete centímetros de gradiente imobilizado (pH 3-10) e coradas com Azul de Coomassie G-250 dos grupos 1 e 2, respectivamente. 44

Figura 41 e 42. Ontologia gênica através do STRING software. Figura 41: Análise das funções moleculares de dez sequências peptídicas válidas de machos adultos de *S. mansoni* do Grupo 1 de e do Grupo 2. Figura 42: Análise dos componentes celulares dez sequências peptídicas válidas de machos adultos de *S. mansoni* do Grupo 1 de e do Grupo 2. 45

Figura 43. Rede de interação gênica de proteínas de *Schistosoma mansoni* identificadas 46

Figura 44. Rede preditiva de interação gênica de proteínas de *Schistosoma mansoni* reguladas. A especificidade da rede foi: Maior confiança: score >0,9 e não mais que 20 interações. 48

Figura 45-46: Comparação entre a concentração de RNA total e proteínas proteínas totais em *Schistosoma mansoni* dos grupos 1 e 2 respectivamente. 51
Figura 47: Concentração de 18s rRNA em *S. mansoni* dos grupos 1 e 2.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Efeito da exposição a 1.4 mg/L do látex de <i>Euphorbia milii</i> na taxa de sobrevivência do hospedeiro definitivo e recuperação de vermes machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos <i>Swiss Webster</i> .	32
Tabela 2. Concentração de elementos químicos no tegumento parasitos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> .	39
Tabela 3. Proteínas diferencialmente expressas identificadas entre os espécimes de adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> provenientes dos grupos 1 e 2, com número do <i>spot</i> , grandeza de expressão, análise de variância (ANOVA), identificação do gene pelo UniProtKB, sequencia de peptídeos por PMF e Mascot, <i>Mascotscore</i> , peso molecular (Mw) e ponto isoelétrico (PI)	42
Tabela 4. Rotas metabólicas preditas com aumento (↑) e redução (↓) de atividade em espécimes de adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> .	49

Lista de Siglas e Abreviaturas

DALY	<i>Disability-Adjusted Life Years</i>
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CL	Concentração letal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DTT	Ditiotreitol
EDS	<i>Energy Dispersive System</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IHPE	Laboratoire Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
Kda	Quiod Dalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LAPSA	Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental
LEE	Laboratório de Esquistossomose Experimental
LPEM	Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular
mBar	miliBar
Mg	Magnésio
mL	Mililitro
mm	milimetro
MW	Molecular Weight
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NuBioMol	Núcleo de Análise de Biomoléculas
PFF	Peptide Fragment Fingerprinting
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto Isoelétrico
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
SEA	<i>Solubleeggantigen</i>
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/ Proteins</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
WHO	World Health Organization
wt%	Peso atômico por cento

1. INTRODUÇÃO

Fatores ambientais abióticos, como temperatura, luminosidade, pH e compostos químicos e bióticos são responsáveis pelos rumos da caminhada evolutiva de indivíduos e espécies, e assim, as alterações da qualidade ambiental conduzem esta trajetória a novos rumos de acordo as variáveis apresentadas (Mayr, 1982). Segundo Buron et al. (2009), compostos presentes no ambiente, como os metais, podem afetar o sucesso da relação parasito-hospedeiro, sendo sua bioacumulação um fenômeno caracterizado em Acanthocephala (Zimmerman et al., 2005), Nematoda (Genc et al., 2008), Cestoda (Jirsa et al., 2008) e Digenea (Ryman et al., 2008). Neste contexto, o ambiente desempenha papel central na dinâmica evolutiva dos parasitos e na esquistossomose esta verdade não é diferente (Roquis, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a esquistossomose é a segunda doença parasitária mais prevalente do mundo, ficando atrás somente da malária. Tendo como base o método *DALY* (*Disability-Adjusted Life Years*- Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade), a esquistossomose apresenta o impacto global de 5,8 milhões de anos de vida perdidos, sendo assim, considerada a doença helmíntica mais relevante do mundo (Olds et al., 1999; Bergquist et al., 2005).

O Trematoda *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), agente etiológico da esquistossomose mansônica, apresenta ciclo evolutivo complexo, onde um indivíduo evolui por três ambientes distintos (límnico, molusco e mamífero) desde sua primeira fase larval até o estágio adulto. Ao longo desta evolução alteram drasticamente sua morfologia e metabolismo, com significativos ajustes na expressão gênica, para se adaptarem as necessidades de cada ambiente. Além disso, fatores ambientais podem influenciar tal expressão modulando múltiplos fatores da vida do parasito.

1.1. O Parasito

Schistosoma mansoni é um parasito da Classe Trematoda, Subclasse Digenea, Família Schistosomatidae, que na fase adulta habita o sistema venoso de mamíferos e apresenta dimorfismo sexual. Os machos possuem canal ginecóforo e tegumento dorsal coberto de tubérculos; a fêmea por sua vez tem o corpo afilado, ovário único e tegumento liso (Silva et al., 2008).

A origem filogenética do grupo *mansoni* é controversa, sendo mais aceita a teoria desenvolvida por Combes (1990), onde o centro irradiador do gênero seria a Ásia e após migração, parasitando pequenos mamíferos para África, houve a diferenciação do grupo *mansoni*. A colonização de homínídeos teria ocorrido por transferência lateral, a partir de pequenos roedores (Lenzi et al., 1997).

O completo desenvolvimento do ciclo de vida de *S. mansoni* ocorre em três ambientes distintos, com a presença de um molusco hospedeiro intermediário e um mamífero hospedeiro definitivo (Figura 1). Os adultos de *S. mansoni* acasalam no sistema porta-hepático e vivem nas veias mesentéricas inferiores, mas apenas as fêmeas migram para as vênulas do plexo hemorroidário para realizar a postura de ovos.

O ovo não operculado apresenta em média 150 µm de comprimento por 65 µm de largura, com um espinho ou esporão lateral na porção posterior medindo cerca de 20 µm e normalmente contém uma única larva ciliada denominada miracídio em seu interior (Figura 2) (Rey, 2008). Ainda no sistema circulatório, imunógenos conhecidos como antígenos solúveis do ovo (SEA, *soluble egg antigen*) mediam a adesão do ovo ao epitélio vascular e sua passagem para a luz intestinal. Cerca de 50% dos ovos caem na luz intestinal, sendo eliminados junto com as fezes no ambiente límnic. Os demais ovos retornam através da circulação sanguínea para o fígado, onde darão origem a granulomas periovulares hepáticos, lesão patognômica da esquistossomose (Lenzi et al., 2008). Não há desenvolvimento embrionário do miracídio após a oviposição.

Os miracídios eclodirão dos ovos devido à associação de múltiplos fatores como a hipotonicidade do meio, temperatura, luminosidade e a própria movimentação do embrião no momento do contato com a água (Figura 3) (Rey, 2008). No meio aquático, o miracídio possui um tempo de vida de aproximadamente 8 horas e por meio de mecanismos de quimiotaxia (glicoconjugados de 80 a 300 KDa) e fototaxia (atração de

miracídio e moluscos pela luz) há o encontro e infecção no molusco (Coelho et al., 2008).

Após a penetração o miracídio perde sua camada ciliada e inicia transformações para a primeira fase intramolusco – o esporocisto primário ou mãe. No intervalo de 10-20 dias pós-infecção, observa-se a formação de centenas de esporocistos secundários ou filhos dispersos, em órgãos como a glândula digestiva e ovoteste com consequente alteração da atividade reprodutiva do molusco (Theron, 1986; Faro et al., 2015).

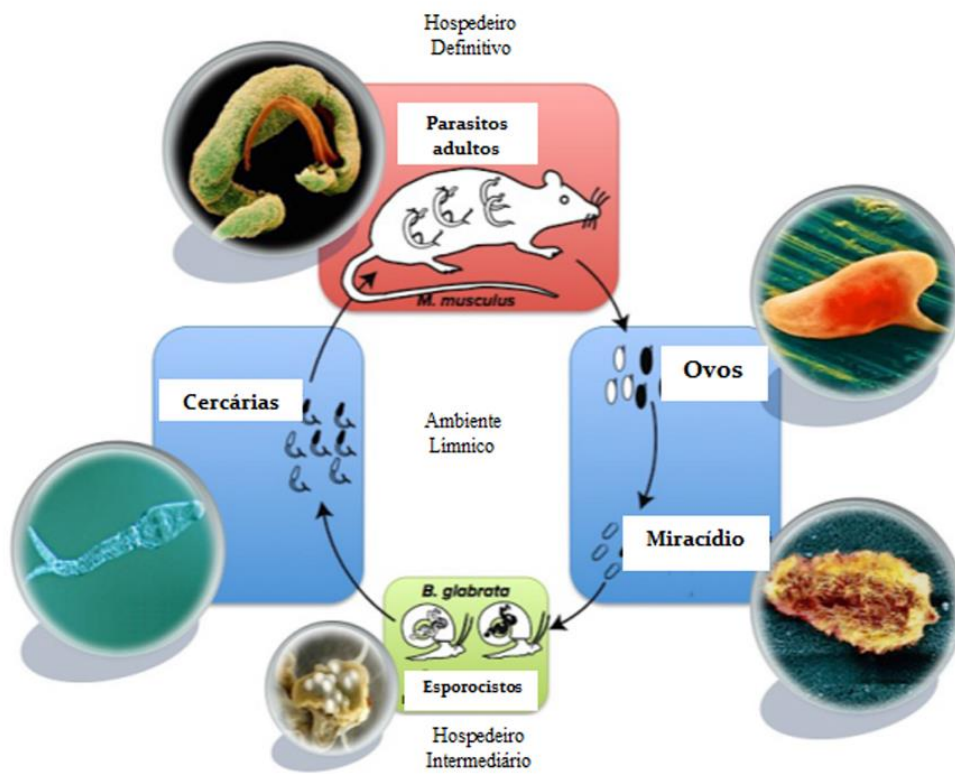


Figura 1. Ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Adaptado de Roquis (2015).

Um molusco infectado por um único miracídio pode liberar milhares de clones de cercárias durante muitos meses, devido à presença de esporocistos replicadores ou terciários capazes de produzir novas gerações de esporocistos secundários, e por fim, cercárias. Após três semanas de infecção as cercárias atravessam o poro de nascimento cercariano, saem pelo tegumento do molusco e assim entram novamente em contato com o ambiente límnic (Rey, 2008).

As cercárias de *S. mansoni* são sensíveis à qualidade físico-química do meio hídrico, devido à permeabilidade do glicocálix disposto na superfície da membrana plasmática trilaminada (Liang et al., 2010). A cercária mede cerca de 500 µm de comprimento, dividido entre o corpo com 200 µm e a cauda bifurcada com 300µm. A região anterior do corpo cercariano é especializada na fixação e penetração no hospedeiro, sendo formada pela ventosa oral, ventosa ventral (acetábulo), sistema digestório, excretor e nervoso, papilas sensoriais e células germinativas responsáveis pela formação dos órgãos sexuais dos adultos (Silva et al., 2008) (Figura 4).

Múltiplos estímulos do ambiente, como temperatura, luminosidade e principalmente sinais químicos (L-arginina) da epiderme do hospedeiro estimulam a natação da cercária, influenciando o processo de infecção no próximo hospedeiro (Lenzi et al., 2008). Segundo Jolly et al. (2007), as cercárias recém-eliminadas são extremamente ativas, sendo altos os níveis de expressão gênica para função mitocondrial e metabolismo energético. Esta breve fase transicional é crítica no ciclo de *S. mansoni* ocorrendo, de um modo geral, uma menor diversidade de transcritos em relação às demais. Para o sucesso do encontro e invasão do tegumento do hospedeiro definitivo, a expressão gênica da cercária está dedicada ao comportamento de natação (via as elevadas quantidades de NADH desidrogenase e suas subunidades, citocromo C e proteínas transportadoras de ATP/ADP) e invasão (via as classes de elastases, proteases, lipases) com significativa redução da viabilidade observada após oito horas de atividade (Jolly et al., 2007).

A invasão no hospedeiro mamífero ocorre através de múltiplos eventos como a intensa atividade natatória das cercárias, mecanismos de localização do hospedeiro, de fixação e de invasão com auxílio das secreções glandulares (lipases e proteases), onde somente a região anterior (corpo da cercária) penetra no hospedeiro (Silva et al., 2008). Intensas modificações ultraestruturais e fisiológicas ocorrem no parasito logo nas primeiras horas após a infecção, com a perda do glicocálix e a conversão do tegumento

trilaminar em heptalaminar (Stirewalt, 1974). Paralelamente, o metabolismo energético se altera de oxidativo para anaerobiose facultativa, com excreção de ácido lático (Coles, 1972).

Nas primeiras 24 horas após a infecção cercariana, altos níveis de expressão da proteína de choque térmico hsp70 (*Heat Shock Protein*) são observados no recém-formado esquistossômulo, possivelmente pela variação de temperatura entre o ambiente hídrico e a temperatura corpórea do hospedeiro mamífero (Neumann et al., 1993). Posteriormente ocorre o alongamento do corpo da larva e a perda sistemática dos espinhos do tegumento com migração, preferencialmente para o sistema venoso. Após cinco a sete dias os esquistossômulos (Figura 5) começam a atingir o lado direito do coração, sendo carreados ao pulmão. Neste ambiente enfrentam a barreira física da vasculatura pulmonar (capilares) e para tal necessitam alongar consideravelmente corpo em comprimento e diminuir em diâmetro. Não há alimentação no pulmão, sendo o metabolismo destinado ao crescimento em aproximadamente 4x em comparação aos esquistossômulos da pele (Lenzi et al., 2008).

Após 15-21 dias de infecção, os esquistossômulos atingem a veia porta hepática, onde rapidamente iniciam a organogênese, com os machos apresentando dois pequenos lobos testiculares e canal ginecóforo pouco desenvolvido e as fêmeas com ovário rudimentar. Após cinco semanas de infecção observam-se os primeiros casais de vermes adultos. Os parasitos machos apresentam o corpo esbranquiçado com comprimento médio de 10 mm, duas ventosas na região anterior (ventosa oral e acetábulo), sistema reprodutor composto por 6 a 10 lóbulos testiculares, com canal ginecóforo bem desenvolvido revestido com inúmeros espinhos no interior, com as extremidades laterais do corpo convergindo para formar o canal. A superfície dorsal do corpo é composta por numerosos tubérculos com espinhos entremeados por papilas sensoriais (Lenzi et al., 2008).

As fêmeas apresentam corpo filiforme e praticamente liso com comprimento médio de 14 mm e duas pequenas ventosas anteriores. Tem coloração escura devido à maior taxa de ingestão e quebra de hemoglobina em hemozoína (Oliveira et al., 2000). O sistema reprodutor é formado por um ovário único, oblongo, posicionado na seção anterior do corpo e capaz de produzir de 190 a 300 ovos por dia (Bogitsh et al., 2005), sendo o acasalamento um evento fundamental para o amadurecimento das fêmeas de *S. mansoni*, incluindo a produção de ovos (Lenzi et al., 2008). Durante o acasalamento há

significativas alterações ultraestruturais e metabólicas que culminam na produção de células vitelínicas, aumento na captação de tirosina, timina e cálcio (Erasmus, 1986).

Os adultos de *S. mansoni* apresentam intensa atividade celular e molecular dedicadas à evasão do sistema imune, à motilidade, aquisição e processamento de nutrientes, formação de pares para o acasalamento e a produção de grandes quantidades de ovos (Jolly et al., 2007). Transcrições gênicas ligadas à degradação de proteínas (catepsina B, catepsina G), produção de ovos e respostas de estresse oxidativo foram descritas nesta fase. No entanto, a maior abundância de transcritos se concentra nas funções de proteínas de superfície, incluindo transportadores de nutrientes, com um número de proteínas previamente identificadas como candidatas vacinais, dentre as quais destacamos Sm23, Sm14, Sm26 e Sm28 (Jolly et al., 2007; Protasio et al 2012).

A relação parasito-hospedeiro existente entre *S. mansoni* e seus múltiplos hospedeiros definitivos expõe a plasticidade fenotípica deste em decorrência do meio. Os vermes adultos completam o ciclo evolutivo em diferentes hospedeiros, dentre estes humanos, hamsters, babuínos, ratos, coelhos, com os quais as interações do parasito com o microambiente (hospedeiro) acarretam diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais do helminto. Em infecções em hospedeiros pouco permissivos, como o rato albino, foram referidos parasitos atrofiados com tubérculos pouco desenvolvidos e ausência de espinhos nos machos (Senft et al., 1978). Desordens no hospedeiro definitivo, como por exemplo, desnutrição, podem alterar o fenótipo dos parasitos adultos com diminuição da área e diâmetro dos lóbulos testiculares e área do ovário (Oliveira et al., 2003).

O casal formado (Figura 6) migra contra a corrente sanguínea do sistema porta hepático para as veias mesentéricas inferiores e seus ramos, sendo as vênulas da parede do reto os locais de oviposição de fêmeas. Aos 45 dias de infecção, os primeiros ovos são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo. Curiosamente até o presente momento não se sabe com precisão o tempo de vida de machos e fêmeas de *S. mansoni*, entretanto suspeita-se que possam atingir até duas décadas dentro do hospedeiro humano (Roquis, 2015).

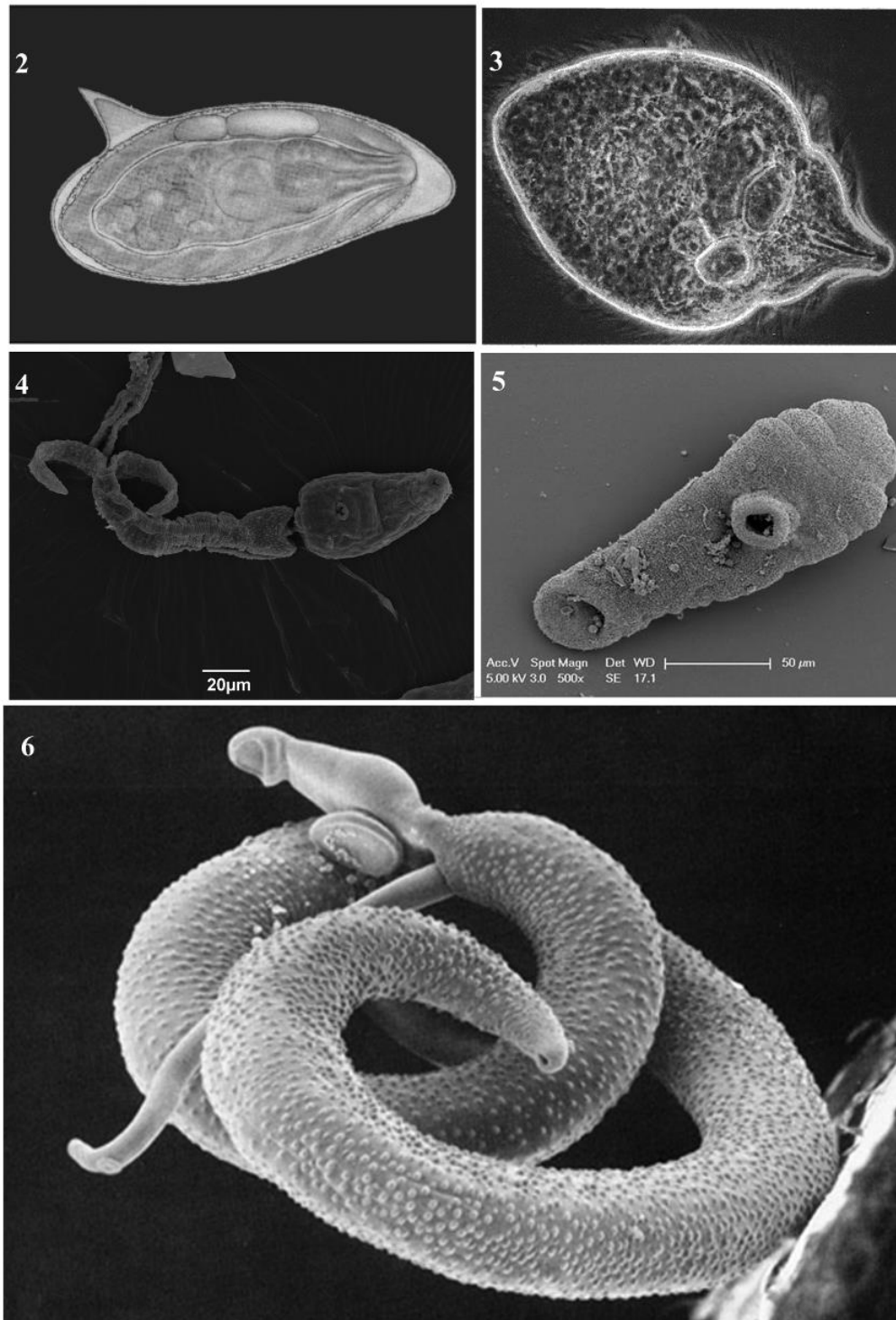


Figura 2-6: Estágios evolutivos de *Schistosoma mansoni*. Figura 2. Ovo. Fonte Science Photo Library, acesso em 12/03/2016. Figura 3. Miracídio. Fonte: www.aber.ac.uk, acesso em 12/03/2016. Figura 4. Cercária. Fonte: LAPSA, IOC, Fiocruz. Figura 5. Esquistossômulo. Fonte www.aber.ac.uk, acesso em 12/03/2016. Figura 6. Casal parasitário. Fonte: www.nhm.ac.uk, acesso em 12/03/2016.

1.2. Esquistossomose mansônica

A introdução do agente etiológico da esquistossomose mansônica no Brasil é controversa, entretanto a análise comparativa entre o DNA mitocondrial da linhagem de *S. mansoni* Americano e Africano sugere que a introdução deste nas Américas teve início de maneira conjunta ao tráfico de escravos realizado entre os séculos XVI a XIX (Desprès et al., 1993). Todavia o registro do primeiro caso de esquistossomose no Brasil foi realizado por Pirajá da Silva, em 1908. Lutz & Penna (1918) durante expedição do Instituto Oswaldo Cruz elaboraram um extenso relatório sobre a situação da doença nos estados do nordeste brasileiro e Madureira-Pará (1949) durante a campanha nacional de erradicação da febre amarela observou que das 6.000 amostras de exames de fezes coletadas 2,3% apresentavam ovos de *S. mansoni*, sendo os estados de Alagoas, Sergipe e Pernambuco os mais afetados.

O enfrentamento da parasitose como um grave problema de saúde pública no Brasil iniciou-se com o inquérito nacional realizado pela Divisão de Organização Sanitária, entre os anos de 1947 a 1952 (Pellón & Teixeira, 1950). Com base nesse estudo o governo federal criou, em 1975, o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), que a partir de 1980 transformou-se no Programa de Controle da Esquistossomose do Sistema de Vigilância em Saúde (PCE/SVS). Atualmente, o referido programa é reconhecido como um dos mais ativos do mundo, devido ao intenso trabalho de vigilância através de levantamentos coproparasitológicos nacionais e ações ativas de pesquisas com o molusco hospedeiro (WHO, 2014). As diretrizes das medidas de controle do programa estiveram sustentadas ora na morbidade, ora no controle da transmissão da doença no decorrer dos anos de atuação.

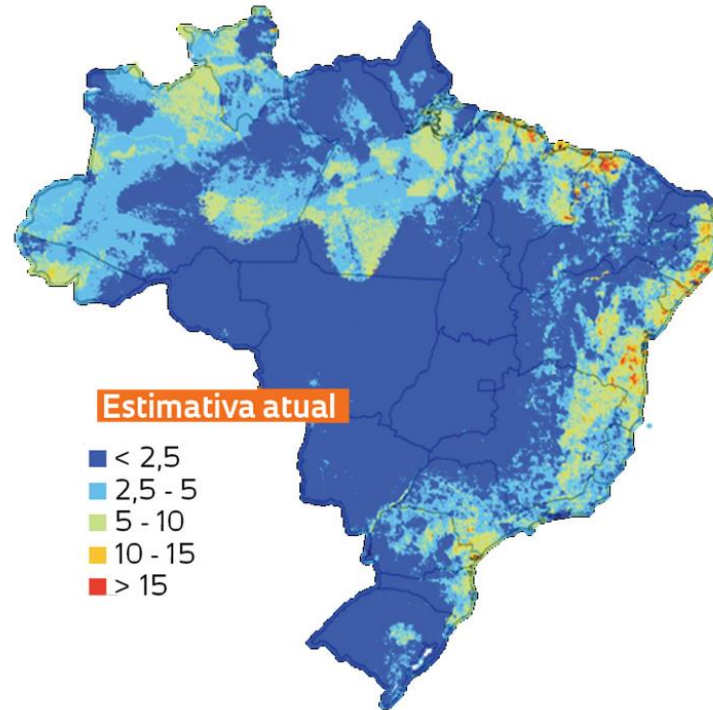
Atualmente, o Brasil é o maior país das Américas em áreas de transmissão da esquistossomose, sendo considerados historicamente endêmicos os estados litorâneos do Maranhão até o Espírito Santo e de maneira focal municípios do Distrito Federal, Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Coura & Amaral, 2004). Scholte et al. (2014) realizaram o mapeamento do risco preditivo de infecção por *S. mansoni* utilizando modelos geoestatísticos e descreveram, como zona de alto risco de infecção, o setor norte da região Norte, a parte oriental da região Nordeste e a região Sudeste. As áreas consideradas de baixo risco estão concentradas na Amazônia e regiões Centro-Oeste e Sul do país (Figura 7).

As projeções mais recentes sugerem que entorno de 5,3% da população brasileira pode estar infectada por *S. mansoni*, ou seja, 10,6 milhões de pessoas, nas cinco regiões geográficas, podem estar atualmente acometidas por essa doença (Scholte et al., 2014). Na base de dados do Sistema Único de Saúde (SUS) verifica-se que durante o período de janeiro de 1995 a dezembro de 2015, 1.615.645 casos de esquistossomose foram confirmados em todas as regiões do país (Brasil, 2016) (Figura 8).

No entanto, fatores como o diagnóstico impreciso e o desenvolvimento silencioso em 90% das pessoas parasitadas, mascaram o real estado da doença no país (Katz & Peixoto, 2000). Indivíduos envolvidos com atividades agrícolas e pesqueiras são os mais acometidos, sendo as crianças o principal grupo etário infectado devido ao uso recorrente de recursos hídricos contaminados para recreação e lazer. A expansão territorial e numérica de casos de esquistossomose é observada no Brasil e tal fato pode estar associado ao hiato no planejamento adequado de fornecimento de água potável e de tratamento de esgoto nas novas áreas de ocupação do território, bem como nas modificações ambientais que favoreçam ao crescimento populacional de moluscos hospedeiros intermediários, e assim, a manutenção de focos de transmissão da doença (Scholte et al., 2014).

No contexto epidemiológico, as espécies *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) e *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) merecem especial atenção por atuarem como hospedeiros da esquistossomose mansônica no país. Dentre as espécies citadas, *B. glabrata* apresenta maior associação com a distribuição da esquistossomose, sendo notificada em 16 estados brasileiros, além do Distrito Federal, e em 806 municípios de uma área delimitada pelos paralelos 0° 53'S (Quatipuru, PA), 29° 51'S (Esteio, RS), 53° 44'S (Toledo, PR) e a linha costeira (Carvalho et al., 2008). Ao redor do mundo, a esquistossomose mansônica continua sendo um grave problema de saúde pública com aproximadamente 67 milhões de pessoas infectadas e 200 milhões sob o risco de infecção por habitarem ou transitarem por regiões endemicamente ativas (Hotez et al., 2008). África, América do Sul, Caribe e Oriente Médio são as principais regiões de transmissão de *S. mansoni* (Rey, 2008).

7



8



Figura 7. Prevalência predita (%) entre 2005-2009 para esquistossomose no Brasil. Fonte: Scholte et al., 2014. Figura 8. Casos de esquistossomose confirmados no Brasil entre o período de janeiro de 1995 e dezembro de 2015. Nota: 1 ponto é equivalente a 70 casos confirmados. Fonte: LAPSA, IOC, Fiocruz.

A mortalidade decorrente exclusivamente da esquistossomose mansônica é baixa, todavia esta patologia apresenta o mais alto grau de impacto socioeconômico das helmintoses humanas (King, 2010). Por ser uma doença silenciosa onde 5-10% das pessoas infectadas apresentam a forma severa da doença e aproximadamente 50% delas apresentam algum tipo de manifestação clínica, constituindo assim, um grave problema de saúde pública (Carvalho et al., 2008).

Para o controle da esquistossomose no Brasil, a OMS recomenda a administração em massa do quimioterápico Praziquantel[®], o controle de moluscos, a educação em saúde e a cooperação técnica entre instituições de saúde e pesquisa para a verificação da eliminação da infecção (WHO 2014). A complexidade requerida para o controle da esquistossomose está de acordo com a complexidade do ciclo de *S. mansoni* e apesar de modelos tradicionais baseados exclusivamente no uso de drogas esquistossomicidas em indivíduos comprovadamente infectados tenha impacto significativo na morbidade, a prevalência se mantém elevada após décadas de tratamento.

Ainda que muitos compostos tenham sido utilizados no passado, estes foram abandonados, devido à baixa eficiência de tratamento, bem como pela ocorrência eventual de efeitos tóxicos ao hospedeiro humano (Rocha Pitta et al., 2013). O aparecimento de resistências, tanto em linhagens laboratoriais, quanto em selvagens é um fator determinante na busca e desenvolvimento de compostos esquistossomicidas. No presente estudo utilizamos a definição de resistência e tolerância a drogas esquistossomicidas de acordo com Coles (2002): "*quando qualquer isolado tem uma taxa de cura significativamente mais baixa do que o isolado mais sensível*". Atualmente o único composto utilizado no homem para o controle e tratamento da esquistossomose mansônica é o Praziquantel[®]. Outros esquistossomicidas como Niridazol[®], Hicantona[®] e Oxaminiquine[®] foram utilizados no século passado, mas foram abandonados por apresentarem baixa eficiência curativa, efeitos colaterais ao hospedeiro e/ou aparecimento de resistência parasitária (Rocha Pitta et al., 2013).

Aspectos como a facilidade no tratamento por via oral, baixo custo, efeitos colaterais curtos e passageiros e alta taxa curativa são fatores estimulantes no uso do Praziquantel[®] como droga de eleição. Contudo após contínuas campanhas de controle e tratamento em massa na África e no Brasil com o referido composto, observam-se alta prevalência e expansão territorial das áreas de infecção (Parker & Allen, 2011). Assim,

grande atenção tem sido destinada ao fato da descoberta de linhagens de *S. mansoni* resistentes ao Praziquantel® (Ismail et al., 1994; Gryseels et al., 2001; Couto et al., 2011). Embora a ocorrência de resistência ainda não seja um mecanismo generalizado entre todas as linhagens do parasito (Greenberg 2013), tal evidência se apresenta muito preocupante e acelera a necessidade de melhor compreender os mecanismos pelos quais o *S. mansoni* possui capacidade de suportar diferentes fatores de estresse. A rápida capacidade de adaptação do parasito frente a várias tentativas de tratamento ou prevenções merece atenção especial de equipes de pesquisa de todo o mundo (Roquis, 2015). Tendo em vista a dificuldade de controle apenas com o uso de quimioterápicos, a OMS estimula outras ações como a pesquisa e desenvolvimento de compostos vacinais, controle de moluscos vetores, educação em saúde e sistema de vigilância integrado.

O desenvolvimento de um produto vacinal, mesmo não apresentando proteção 100% eficaz, poderia contribuir de maneira significativa com a redução da carga parasitária e eliminação de ovos pelo hospedeiro no ambiente, e assim, com a transmissão da doença. Lamentavelmente este composto ainda não está disponível para uso comercial. Dentre os candidatos vacinais, Sm14 é o único caracterizado por um país endêmico com segurança ecotoxicológica estabelecida, e encontra-se em estágio avançado de desenvolvimento. Esse é um antígeno de 14 KDa presente no esquistossômulo e adultos de *S. mansoni*. Tal produto confere atividade protetora de 67% em camundongos desafiados com 150 cercárias de *S. mansoni* linhagem LE (Carvalho et al. 2008). Embora tais resultados sejam animadores, a vacina não confere proteção total contra a esquistossomose e ainda se encontra em fase de Teste Clínico II (Tendler et al., 2015).

O combate à transmissão através do emprego de moluscidas não é recente e tem sido defendida como a única atividade com possibilidade da interrupção da transmissão em pequenos focos epidemiologicamente ativos (Katz, 2003; Teles & Carvalho 2008). Segundo Teles & Carvalho (2008) “*o uso de moluscidas é, em geral, recomendado para o controle da transmissão da endemia em focos isolados de áreas rurais e urbanas, onde os prejuízos ambientais não são maiores que os resultantes da própria contaminação humana com detritos e dejetos*”. Takougang et al. (2006), utilizando a dose de 0,50 g/m³ de Bayluscide® aplicado em duas vezes de 0,25 g/m³, obtiveram alta mortalidade entre os caramujos alvos e baixa letalidade para peixes, sapos e girinos. Os autores reconheceram que os efeitos sobre outros

organismos aquáticos diminuem a aceitabilidade do Bayluscide® e sugeriram que mais estudos seriam necessários para avaliar a relação custo-benefício desse produto no controle da esquistossomose.

Apesar dos promissores resultados obtidos a partir do Bayluscide®, este composto, nas doses recomendadas, apresenta atividade biocida em organismos não-alvos como plantas e animais, genotoxicidade e efeito carcinogênico (Hamed, 2010). Estes fatores, associados ao alto custo do produto, à possibilidade de recolonização após a interrupção do tratamento, à alta toxicidade ecológica e à resistência desenvolvida pelo uso exclusivo em indivíduos do gênero *Biomphalaria*, são fatores limitantes para o uso desse composto em programas oficiais de controle de larga escala (Mello-Silva et al., 2006; Hamed 2010).

Neste sentido, pesquisas de compostos de origem vegetal, com atividade moluscicida em baixas doses, biodegradáveis, mais baratos e menos agressivos ao ambiente tem sido intensamente pesquisados (Mello-Silva et al., 2010; Singh et al., 2010; Augusto et al., 2015). Dentre os grupos botânicos pesquisados, espécimes da família Euphorbiaceae apresentam atividade moluscicida maior que qualquer moluscicida sintético para hospedeiros intermediários de parasitos de importância médica e veterinária (Singh & Agarwal, 1984). Apesar destes resultados, o uso de espécies desta família é controverso devido à grande diversidade de metabólitos secundários, dentre eles a proteína ricina, que é altamente letal, presente em *Ricinus communis* (Palatnick & Tenenbein, 2000).

Entretanto, outros membros da família Euphorbiaceae possuem relevantes compostos medicinais utilizados comercialmente, como a solução nasal de *Euphorbium compositum* proveniente do látex de *Euphorbia resinífera* indicada para infecções virais, rinite, sinusite, entre outras; Dysentral® proveniente do extrato de *Euphorbia hirta* e indicado ao tratamento de doenças diarreicas; Radix® proveniente do extrato de raízes de *Euphorbia kansui* utilizado como purgativo, dentre muitas outras espécies. Das espécies pertencentes a esta família, *Euphorbia milii* var. *hislopii* (syn. *splendens*) (Des Moulins, 1826) é considerada a mais promissora para o uso em programas oficiais de controle da esquistossomose de acordo com os requisitos preconizados pela OMS (WHO, 2002; Mello-Silva et al., 2006).

1.3. O látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*

Com mais de 200 espécies, o gênero *Euphorbia* é uma importante fonte de recursos medicinais para uso humano e veterinário, bem como na agricultura (Shi et al., 2008). De maneira geral, apresentam abundância de compostos fenólicos (Rice, 1974), bem como grupos de metabólitos secundários, tais como alcalóides, terpenos, glucosinolatos, taninos, triterpenos, sesquiterpenos, cerebrosídeos, gliceróis, flavonóides e esteróides, entre outros (Seigler, 1994; Shi et al., 2008). Devido às suas potenciais aplicações médicas e biológicas, este gênero tem sido objeto de abundantes investigações fitoquímicas e farmacológicas. Como exemplos das atividades biológicas ligadas ao látex, citamos: ação antibacteriana, citotóxica, antimicrobiana e anti-inflamatória; modulação de multirresistências a drogas, usadas como antiviral; eficácia no tratamento para gonorréia, enxaqueca, parasitos intestinais, verrugas, reumatismo, picadas de cobra, além da ação nematocida e moluscicida, dentre outros (Lirio et al., 1998; Shi et al., 2008; Singla & Pathak, 1990; Vlietink, 1987; Jain, 1996; Bhatnagar et al., 2000).

Euphorbia milii var. *hislopii* é um arbusto com folhas alternas, simples, flores unissexuais, reunidas em inflorescências tipo ciátio, com brácteas vermelhas e invólucro campanulado com cinco glândulas apicais (Corrêa, 1984). Comumente chamada de coroa-de-cristo, *E. milii* é um arbusto originário de Inselberge, localizado no planalto central de Madagascar (África), facilmente cultivável por não necessitar de cuidados com o solo, fertilizantes e água (Schall et al., 2001). De maneira geral, látex é definido como uma emulsão aquosa encontrada no vacúolo das células secretoras (laticíferos) composta por lípidos, resinas, açúcares, proteínas e enzimas (El Moussaoui et al., 2001).

Dentre as frações bioativas do látex de *E. milii*, oito categorias de miliaminas foram isoladas e testadas quanto a sua atividade moluscicida em *B. glabrata*, sendo L-milliamina a de maior eficiência, com letalidade de 90% quando usado em solução abaixo de 0.1ppm (Zani et al., 1993). Subhash et al. (2006), purificaram uma serina protease denominada “Milin” com peso molecular de 51 kDa e que apresenta atividade ótima em pH 8,0 a 60°C, principalmente sobre os substratos caseína e azoalbumina. Também há relatos de outra protase de 30 Kda no referido látex denominada de eumilina com atividade caseinólítica e fibrinogenólítica (Fonseca et al., 2010). Uma vasta gama de aplicações foi relacionada ao látex de *E. milii* ao longo dos anos,

entretanto a pesquisa da atividade moluscicida foi iniciada por Vasconcellos & Schall (1986) contra *B. glabrata* e *B. tenagophila* em concentrações menores que 0,5 ppm. Com base nos promissores resultados obtidos, o Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ) depositou a patente de coleta, uso e armazenamento em 1998.

O extrato *in natura* de *E. milii* é uma solução complexa e quando não diluída pode causar reação inflamatória em mucosas e pele íntegra pela ação de ésteres de forbol e proteases com atividade em pH ácido (4,5 a 5,5), bem como queimação nos lábios, na língua e na mucosa bucal em caso de ingestão (Fonseca et al., 2010). Para o uso como moluscicida, muitos autores avaliaram a toxicidade do produto nas doses recomendadas e não foram observados efeitos carcinogênicos ou mutagênicos (Marston & Hecker, 1983), irritabilidade cutânea ou ocular em coelhos, citotoxicidade (Zamith et al., 1996), embriofetotoxicidade (Souza et al., 1997) e ecotoxicidade (Oliveira-Filho & Paumgarten, 1997). A atividade moluscicida se mantém inalterada por 124 dias em frasco escuro e vedado na temperatura ambiente e 736 dias nas mesmas condições sob refrigeração 10-12°C (Schall et al., 1992).

Os moluscos hospedeiros intermediários *B. glabrata*, *B. straminea*, *B. tenagophila*, *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss, 1848), *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817) (= *Lymnaea columela*), *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774), *Achatina fulica* Bowdich, 1822 e *Bulinus* sp., foram expostos ao produto (Mello-Silva et al., 2011; Mello et al., 2010; Vasconcellos & Schall, 1986; Giovanelli et al. 1999; Vasconcellos & Amorin, 2003; Oliveira, 2007). O látex também apresentou resultados promissores no controle do Diptera *Megaselia scalaris* Loew 1866 e o Nematoda *Heterodera cajani* Koshi 1967 (Mello et al., 2010; Devi & Gupta 2000).

Em *B. glabrata*, a exposição ao látex de *E. milii* por 24 horas, em concentrações abaixo de 2 mg/L, afeta significativamente a biologia reprodutiva, estoques energéticos e produtos de excreção de moluscos infectados e não infectados. Lima et al. (2012) descreveram o estresse ocasionado pelo látex na redução dos estoques glicídicos na massa cefalopediosa e glândula digestiva, bem como na alteração do perfil de produtos nitrogenados de excreção de *B. glabrata*, onde há aumento no nível de uréia com a diminuição dos níveis de ácido úrico. Os efeitos da exposição são responsáveis por redução significativa na atividade reprodutiva de *B. glabrata* não infectada e infectada por *S. mansoni* (Mello-Silva et al., 2007; Augusto et al., 2015). Curiosamente não há ação biocida em ovos postos nas concentrações utilizadas. Schall et al. (1998)

observaram que somente a partir 870 mg/L o látex começa a ter efeito embriotóxico sobre os ovos postos de *B. glabrata*.

Em moluscos infectados por *S. mansoni* é observado um mecanismo semelhante aos não infectados, entretanto, quando infectados observam-se o aumento da gravidade dos efeitos descritos em animais sadios e significativa redução na sobrevivência (Lima et al., 2012). Tal fato corrobora a hipótese de ação seletiva do látex de *E. milii* no controle de populações *B. glabrata* em ações de controle da esquistossomose (Mello-Silva et al., 2010).

Mendes et al. (1997) realizaram testes de campo em Comercinho, município do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, onde conseguiram eliminar a presença do molusco hospedeiro intermediário pelo período de três meses consecutivos. Houve recolonização dos sítios experimentais e os autores discutiram a possível relação com mecanismos de escape e ou com a eclosão de novas massas ovíferas provenientes de áreas não tratadas. Tal fato sugere que as aplicações do látex devem ser realizadas de maneira periódica e ao longo da bacia hidrográfica do foco epidemiológico. Schall et al. (2001) realizaram testes similares em distintas regiões endêmicas de Minas Gerais com interrupção do ciclo de *S. mansoni* por um período de até 14 meses.

Sendo o látex de *E. milii* uma alternativa plausível no controle da esquistossomose, De-Carvalho et al. (1998) analisaram os possíveis efeitos deste composto nas demais fases do ciclo de *S. mansoni*. Em testes de concentração gradual (de 10 a 100 mg/L), os autores não observaram efeitos letais sobre ovos, miracídios e de *S. mansoni* no ambiente hídrico. Embora a concentração demonstre não ter efeito sobre a sobrevivência de *S. mansoni*, há indícios de correlação positiva entre o tempo de exposição e a mortalidade de miracídios e cercárias (Barky & Mohamed, 2011).

Os efeitos tóxicos do látex sobre as formas parasitárias vão além da análise de sobrevivência e mortalidade. Augusto et al. (2015) observaram a viabilidade do ciclo de *S. mansoni* após o contato de ovos, miracídios e caramujos infectados (1^o a 8^o semanas de infecção) com o mesmo látex. Segundo os autores, a exposição influenciou negativamente o desenvolvimento do parasito no hospedeiro intermediário, com a consequente redução na eliminação de cercárias em todos os grupos observados. El-Ansary et al. (2001) atribuíram a eficácia do composto à interferência na via glicolítica ocasionada pelo látex de *E. milii*. De maneira geral, compostos fitoquímicos atuam na atividade das enzimas hexoquinase, glicose fosfato isomerase e piruvato quinase, três

importantes enzimas glicolíticas, e assim, alteram o desenvolvimento do parasito em seu hospedeiro. O uso de substâncias que auxiliem na redução da transmissão como medida complementar em criadouros de importância epidemiológica torna-se uma estratégia interessante para o controle da esquistossomose.

2. JUSTIFICATIVA

Para o controle da esquistossomose, dois aspectos devem ser especialmente considerados: morbidade e transmissão. O Plano Estratégico para Controle de Doenças Negligenciadas 2012-2020 da OMS inclui diretrizes para o controle da esquistossomose mansônica no Brasil. O controle deve ser baseado na aplicação da quimioterapia preventiva em conjunto com educação para a saúde, acesso à água potável, melhoria do saneamento e controle do molusco hospedeiro intermediário por intermédio de moluscicidas no foco epidemiológico. Salvo pequenos projetos pontuais, o controle da esquistossomose tem se baseado no uso de quimioterápico ao longo do tempo, entretanto esta parasitemia, ainda figura entre as mais importantes doenças ligadas a pobreza no país, com 1.615.645 casos confirmados entre 1995 e 2015 (Brasil, 2016).

A pesquisa e desenvolvimento de compostos que possam auxiliar no controle da transmissão de *S. mansoni* estão de acordo com as diretrizes do Plano Estratégico da OMS, e neste sentido o Instituto Oswaldo Cruz se mostra pioneiro em estudos com o látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*. Após três décadas de pesquisas, o IOC, detentor da patente do látex, possui longo histórico em abordagens experimentais, sendo a eficácia do produto reconhecida por diferentes grupos de pesquisa. A proposta de uso do látex exclusivamente como moluscicida, deixa um hiato de conhecimento quanto sua ação no parasito. Os poucos trabalhos com esta abordagem dão enfoque à tolerância e viabilidade de cercárias. No entanto, uma análise ampla da influência de baixas concentrações do látex na dinâmica parasitária do *S. mansoni* se faz necessária.

A proposta deste trabalho foi analisar os efeitos que as cercárias de *S. mansoni* expostas a uma concentração subletal do látex de *E. milii* var. *hislopii* podem induzir nos parasitos adultos avaliando se ocorrem alterações na dinâmica parasitária. Assim, uma avaliação da taxa de recuperação de vermes adultos, do número de ovos postos pelas fêmeas, de possíveis alterações ultraestruturais na superfície do tegumento e das diferenças na expressão proteica dos adultos poderão responder a estas demandas.

3. OBJETIVOS

Estudar os efeitos que as cercárias de *S. mansoni* expostas a uma concentração subletal do látex de *E. milii* var. *hislopii* podem induzir nos parasitos adultos e em sua dinâmica parasitária em condições experimentais.

3.1. Objetivos específicos

- 1- Comparar a dinâmica parasitária do ciclo experimental do *S. mansoni* em condições normais e associado à exposição de cercárias ao látex de *E. milii* var. *hislopii*;
- 2- Avaliar as alterações morfológicas ultraestruturais do tegumento dos adultos de *S. mansoni* oriundos de cercárias expostas ao látex;
- 3- Avaliar os elementos químicos na composição do látex de *E. milii* var. *hislopii* e suas alterações na composição de elementos químicos na superfície do tegumento dos adultos de *S. mansoni* oriundos de cercárias expostas ao látex;
- 4- Estudar o perfil de expressão de proteínas de adultos de *S. mansoni* e identificar as proteínas diferencialmente expressas nos parasitos oriundos de cercárias expostas ao látex.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenho Experimental

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) do IOC e aprovado com o número de registro CEUA-FIOCRUZ LW-07/13, estando de acordo com as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA, IOC, Fiocruz) em colaboração com os seguintes laboratórios: Laboratório de Esquistossomose Experimental (LEE, IOC, Fiocruz); Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol), Núcleo de Microscopia e Microanálise e Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LPEM), Universidade Federal de Viçosa (UFV/MG) e Laboratoire Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements (IHPE), Université de Perpignan, França.

Para tanto, cercárias de *S. mansoni* (linhagem LE) foram obtidas de moluscos *B. glabrata* (linhagem BH) infectados com 7 ± 1 miracídios após exposição à luz artificial. As cercárias eliminadas foram separadas em dois grupos experimentais, sendo o grupo 1 mantido em água desclorada pelo período de 1 hora, sendo assim o controle do presente experimento e o grupo 2 exposto à solução aquosa de látex liofilizado de *E. milii* na concentração de 1,4 mg/L pelo mesmo período de uma hora (Figura 9). Para as análises realizadas no LEE foram infectadas 60 camundongos fêmeas com 4 a 6 semanas de idade divididas, sendo 30 camundongos infectados com cercárias do grupo 1 e 30 camundongos infectados com cercárias do grupo 2. Este experimento foi repetido em triplicata. Após 65 dias de infecção os vermes adultos foram coletados e conservados em etanol 70% para as análises ultraestruturais e mantidos à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as análises proteômicas.

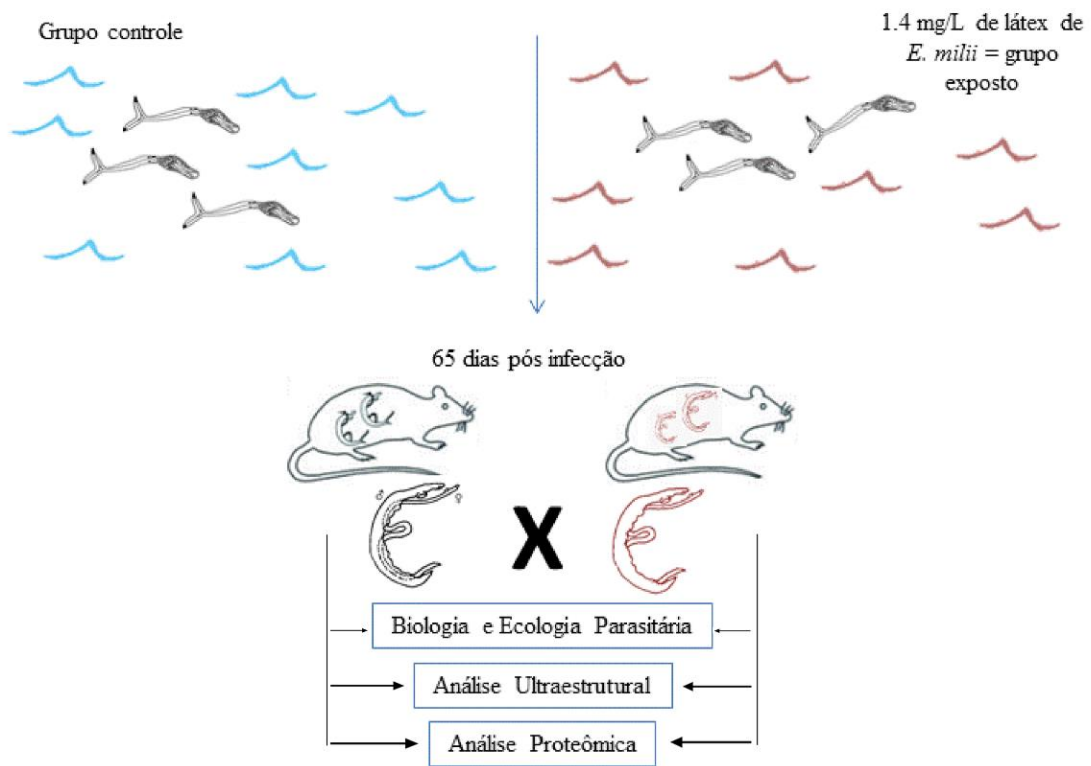


Figura 9. Esquematização do desenho experimental desenvolvido.

4.2. Coleta, liofilização e cálculo da dose letal (DL₉₀) e sub-letal (DL₅₀) do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopü*

As amostras do látex *in natura* de *E. milii* var. *hislopü* foram coletadas na localidade Ilha do Governador (22°48'09''S/43°12'35''W), Rio de Janeiro, seccionando-se o caule a aproximadamente 2 centímetros abaixo do meristema apical para a coleta do material em frascos de vidro esterilizado, mantidos sob a proteção de luz solar e refrigerados em gelo até o armazenamento em laboratório (Figura 10) (Vasconcellos & Amorim 2003). Para a liofilização, amostras de 5mL de látex *in natura* por garrafa de vidro do tipo Vial foram pré-congeladas em gelo seco e etanol absoluto. O látex congelado foi liofilizado abaixo de -52°C sob pressão de 8×10^{-1} mBar utilizando Módulo 4K Freeze Dryer (Edwards High Vacuum Int., UK) por três ciclos de 12 horas em cuba acrílica. O líófilo foi mantido em freezer sob proteção de luz até o momento da diluição.

Para a determinação da concentração subletal (CL₅₀) foi realizada a diluição de 1g de látex liofilizado em água desclorada com o auxílio de um balão volumétrico, homogeneizado através de ultrassom por 20 minutos para a obtenção de concentração final de 1000 mg/L = µl/L, ou seja 1000 ppm (solução –mãe). Sete concentrações aquosas (0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 mg/L) com aumento gradual da concentração do látex de *E. milii* foram realizadas, sendo desafiados 20 exemplares de *B. glabrata* por concentração, medindo 8 - 12 mm de diâmetro de concha, mantidos na solução por 24 horas. Como controle, 20 moluscos foram mantidos em água desclorada (Vasconcellos & Amorim, 2003). O cálculo da concentração letal foi realizado através da análise dos próbites (Finney, 1971).

4.3. Manutenção dos moluscos em laboratório e infecção do hospedeiro intermediário

Para os experimentos foram utilizados exemplares de *B. glabrata* (linhagem Lagoa da Pampulha/ Belo Horizonte - BH) mantidos no LEE. Os moluscos foram mantidos em aquários de polietileno de 6 litros de capacidade, com água desclorada (decantação e evaporação do cloro), temperatura da água em $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e do ambiente em $28 \pm 3^\circ\text{C}$. A luminosidade foi controlada (12h de luz / 12h de escuridão) e semanalmente os aquários foram limpos, sendo os caramujos alimentados diariamente *ad libitum* com folhas de alface frescas (*Lactuca sativa L.*). Os moluscos foram infectados de maneira individual em placa de 24 poços com 7 ± 1 miracídio de *S. mansoni* (linhagem LE) durante uma hora sob luz artificial (Figura 11).

4.4. Manutenção de camundongos e infecção do hospedeiro definitivo

Foram utilizadas exemplares fêmeas de *Mus musculus* (linhagem Swiss Webster) produzidas pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz (CECAL) e mantidas no biotério do Pavilhão Cardoso Fontes, IOC, Fiocruz. Os camundongos foram recebidos com 4 a 6 semanas de idade e após duas semanas de aclimação foram desafiados a infecção com cercárias de *S. mansoni* (linhagem LE). O processo de infecção ocorreu por via subcutânea com 150 cercárias de *S. mansoni* no dorso do animal com o auxílio de uma seringa descartável de insulina de 1mL e agulha de 0.4mm x 13mm, conforme preconizado por Peters & Warren (1969) (Figura 12).

Os camundongos foram mantidos segundo as normas de bioética e biossegurança do biotério do Pavilhão Cardoso Fontes, em microisoladores (Figura 13), sob condições padronizadas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclos de 12h de claro e 12h de escuro).



Figura 10. *Euphorbia milii* var. *hislopilii* (syn *splendens*) (Des Moulins, 1826). Figura 11. Exemplar de *Biomphalaria glabrata* (linhagem BH) durante processo de infecção por *Schistosoma mansoni* (linhagem LE). Figura 12. Exemplar de *Mus musculus* (linhagem *Swiss webster*) durante processo de infecção por *S. mansoni* (linhagem LE). Figura 13. Microisoladores contendo *M. musculus* infectados por *S. mansoni* no biotério do Pavilhão Cardoso Fontes, Fiocruz-RJ.

4.5. Análises Parasitológicas e Ecológicas

Para avaliar a capacidade reprodutiva de vermes adultos de *S. mansoni* foram realizadas análises coproparasitológicas de Kato-Katz em cada caixa (5 camundongos por unidade) no período da manhã (10-12h). Os camundongos foram mantidos em caixas estéreis pelo período de uma hora e todas as fezes produzidas foram recolhidas e homogeneizadas antes do início da análise. Este procedimento foi repetido três vezes em cada caixa com camundongos infectados com cercárias expostas ao látex e com cercárias do grupo controle.

Para investigar a influência do estresse em cercárias de *S. mansoni* causado pela exposição ao látex de *E. milii* na história de vida do parasito adulto, foram calculadas a capacidade de formação de vermes e a relação macho/fêmea de parasitos adultos. As análises da estrutura populacional entre os grupos foram feitas de acordo com Lepesant et al. (2013) tendo como base que, em infecções de *S. mansoni* há eliminação de cercárias 50% machos e 50% fêmeas (1:1). Para tanto, as seguintes fórmulas serão utilizadas: Taxa de Infecção = número de parasitos recuperados em cada sexo / 50% cercárias e Proporção sexual = número de parasitos machos / número de parasitos fêmeas.

4.6. Análise de Ultraestrutura de parasitos adultos de *Schistosoma mansoni*

A ultraestrutura de parasitos adultos foi analisada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Espécimes de *S. mansoni* de ambos os grupos foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2, pós fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M por uma hora à temperatura ambiente e ausência de luz. As etapas de desidratação foram realizadas em série de acetona (70%, 80%, 90%, 100%) e ponto crítico em CO₂. Os espécimes foram metalizados em ouro e observados no microscópio Zeiss DSM 940, localizado na Plataforma de Microscopia Eletrônica da Fiocruz.

4.6.1. Microscopia Eletrônica de Varredura associada a um Detector de Espectrometria de Energia Dispersiva (MEV-EDS);

Para a análise qualitativa e semi-quantitativa da composição elementar das camadas superficiais do tegumento de parasitos adultos e do látex liofilizado utilizou-se a associação de Microscopia Eletrônica de Varredura com raio-X através de sonda EDS (Energy Dispersive System), onde os elementos são determinados através da reflectância do espectro de raio-X em uma determinada área comum das amostras a serem comparadas. Os resultados obtidos foram expressos em peso atômico por cento para cada elemento previamente selecionado (wt%). Para tanto, foram seriadas desidratações em série alcoólica (80%, 90% 100%), ponto crítico com CO₂ e cobertura com carbono. Amostras de látex liofilizado também foram recobertas em carbono para posterior leitura em sonda EDS.

Todas as amostras foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Leo 1430VP com sonda X-ray (EDS). Foi selecionada a leitura de quinze elementos químicos para avaliar a composição do látex e sua possível bioacumulação no tegumento de parasitos machos adultos, sendo eles: N (Nitrogênio), Na (Sódio), Mg (Magnésio), Al (Alumínio), K (Potássio), Cr (Cromo), Fe (Ferro), Cu (Cobre), Rh (Ródio), Pd (Paládio), Ag (Prata), Cd (Cádmio), Pt (Platina), Hg (Mercúrio) e Pb (Chumbo). Este procedimento foi conduzido no Núcleo de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CBS), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

4.7. Análise Proteômica

4.7.1. Extração, Quantificação de Proteínas Totais de *S. mansoni* e Eletroforese Bidimensional

Estes procedimentos foram realizados no NUBioMOL (UFV). As análises foram realizadas utilizando cinco machos e oito fêmeas de cada grupo. Os parasitos adultos foram colocados em solução de extração (Ureia 7M, Tiourea 2M e 4% CHAPS) e sonificados por 10 segundos em três etapas. A quantificação de proteínas foi realizada usando o método de Bradford (Bradford, 1976) e pelo 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Sweden), sendo as amostras estocadas em freezer -80 °C. Alíquotas de 150µg de proteínas totais foram diluídas para um volume total de 125µL de solução Destreak (GE Healthcare, Suécia) e 2% tampão IPG (pH 3–10) (GE Healthcare, Suécia). Fitas de sete centímetros (Immobiline, GE Healthcare, Suécia) com gradiente imobilizado de pH (3-10) foram reidratadas com o extrato protéico total por 20h em IPGBox (GE Healthcare, Suécia).

A focalização isoeletrica foi iniciada imediatamente após a reidratação através do sistema automatizado IPGphor (Ettan IPGphor III, GE Healthcare, Suécia) a 20 °C com corrente constante de 50 µA/fita e total de 11,7kVh seguindo quatro etapas programadas: 1- 300V por 15h, 2- 300vh em gradiente até 1000V; 4000vh em gradiente até 5000V e 2000vh em gradiente até 5000V. Após a focalização isoeletrica, as fitas foram expostas ao tampão de equilíbrio (Ureia 6M, Tris HCl 0.075M (pH 8.8), 29.3% Glicerol, 2% SDS e 0.002% de Azul de Bromofenol) contendo 2% de Ditiotreitolo (DTT) por 60 minutos e alquiladas por 60 minutos em tampão contendo iodoacetamida a 5%.

Para a segunda dimensão, as fitas foram postas na parte superior de géis de poli-acrilamida (12.5%) em um sistema Mini Protean Cell (Bio-Rad, EUA). A eletroforese foi realizada de maneira constante a 80V por aproximadamente três horas para cada réplica. Os géis foram corados com Azul de Coomassie G-250 por 72h e escaneados via ImageScanner III (GE Healthcare, Suécia) através do software Labscan (GE Healthcare, Suécia). Os *spots* foram quantificados e analisados usando o software

ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, Suécia) e a abundância de cada *spot* foi calculada pela porcentagem em volume (vol%) em relação a imagem escaneada. Durante as análises, os *spots* que apresentaram variação de sobreposição de medidas (*ratio*) acima de 1,5 e o teste estatístico ANOVA com $p < 0,05$ foram considerados diferencialmente expressos.

4.7.2. Excisão, Tripsinólise e Espectrometria de Massas

Os *spots* diferencialmente expressos foram manualmente excisados e submetidos ao processo de tripsinólise em gel. Inicialmente foram realizados processos de lavagem em (acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 0,025M), desidratação em acetonitrila 100% e centrifugação à vácuo em temperatura ambiente. As proteínas foram reduzidas em DTT 65mM e alquiladas em iodoacetamida 100mM. As amostras foram digeridas à 37 °C overnight na presença de tripsina porcina (SIGMA, EUA) diluída em bicarbonato de amônio (40mM) e acetonitrila 10% para uma concentração final de 25ng/μL. Os peptídeos trípticos foram extraídos do gel em solução de acetonitrila (50%) em ácido fórmico (5%). Tais peptídeos foram transferidos para tubo estéril, desidratados à vácuo e suspensos em solução de acetonitrila (50%) e ácido trifluoroacético (0,1%).

Alíquotas de 1,0μL de cada amostra e 1,0 μL de matriz α-Ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics, Alemanha) foram aplicadas em placa de aço polida e introduzidas no espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Alemanha). Todos os espectros foram obtidos em razão massa-carga (m/z) de 800-4000 KDa e analisados via FlexAnalysis 3.3 software (Bruker Daltonics, Alemanha).

As listas de massas referentes aos espectros de massas obtidos por MS1 e MS2 (MS-MS) foram analisadas usando os algoritmos “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) e “MS-MS Ion Search” (PFF – Peptide Fragment Fingerprinting), respectivamente, para a identificação das proteínas, utilizando o software MASCOT DAEMON, versão 2.2.07 (Matrix Science, Inglaterra). Para aumentar a sensibilidade de buscas, todos os peptídeos foram pesquisados em banco de dados específico para membros da família Schistosomatidae (Schistosomatidae Protein DataBase em UniProt DataBase - download em 27/03/2015 com 40.657 proteínas). Os parâmetros de busca foram: erro

de 0,5 kDa para a identificação de peptídeos, e parâmetros de modificações pós-traducionais tendo como modificação fixa a carbamidometilação dos resíduos de cisteína (alquilação com iodoacetamida) e como modificação variável a oxidação da metionina.

O Scaffold software 4.4.1.1 (Proteome Software, EUA) foi usado para visualizar e validar os resultados MS2 baseados em peptídeos e proteínas identificadas. Foram considerados válidos os peptídeos com probabilidade de acerto maior que 90% de acordo com o algoritmo *Peptide Prophet* (Keller et al., 2002), sendo as proteínas identificadas validadas com probabilidade maior que 90% de acordo com o algoritmo *Protein Prophet* (Nesvizhskii et al., 2003). O software Peaks 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) foi usado para realizar *Peptide De Novo* Sequencing (Ma et al., 2003). Os processos biológicos afetados pela expressão diferencial das proteínas identificadas e confirmadas foram analisados através de dados do Gene Ontology (GO) presente em UniProt, KEGG Pathway (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e Schistodb.

A base de dados STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) foi utilizada para compreender as interações proteína-proteína de cada grupo. Este software consiste em uma ampla base de dados de proteínas descritas e preditas, bem como suas interações (Emily et al., 2009). Além das interações de caráter direto (físico) e indireto (funcional) outros métodos de associações são previstos na STRING, como vizinhança (a maior proximidade de genes no genoma indica que as proteínas codificadas participam da mesma rota metabólica), co-ocorrência (semelhança entre padrões de ausência e presença de genes em diferentes organismos), fusão (associação funcional de proteínas), co-expressão (associação baseada em expressão simultânea de genes no mesmo organismo), experimentos e database (associações extraídas de anotações em outras bases de dados) e *textmining* (ocorrência de genes e proteínas citadas frequentemente em resumos de artigos). As inferências descritas por este software são estatisticamente baseadas em um grau de confiança (*confidence score*), tendo sido usado o mais alto nível de confiabilidade (*score >0,9: highest-confidence interactions*) e não mais que 20 interações proteína-proteína. Nossas proteínas identificadas e confirmadas foram agrupadas em processos biológicos e funções moleculares de acordo com sua ontologia anotada no STRING, KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) e Gene Ontology no UniProtKB.

4.8. Extração de RNA e Quantificação do gene 18S rRNA

Estas análises adicionais foram realizadas durante o Doutorado *Sandwich* pelo Programa Ciência sem Fronteiras no IHPE (Université de Perpignan, França). Para tal, foram utilizados hospedeiros intermediários e parasitos de mesma linhagem, Belo Horizonte – BH e *SmLE*, seguindo os mesmos protocolos de infecção de hospedeiros intermediários e definitivos descritos acima, visando possibilitar a comparação de dados e redução do viés pseudorepetitivo quanto ao modelo e localidade, como definido por Hurlbert (1984).

Após a perfusão, foram utilizados 25 espécimes de cada grupo separados em subgrupos de 5 espécimes em cada. As extrações do RNA total de espécimes adultos do grupo 1 e do grupo 2 foram realizadas separadamente em nitrogênio líquido, clorofórmio e Trizol seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante (Sigma Life Science, St. Louis Missouri, EUA). Para tal os parasitos foram macerados com bastão e *beads* esféricas de 106 microns (Sigma, cat#G4649) por cinco minutos na presença de Trizol e mantidos a temperatura ambiente por cinco minutos na presença de clorofórmio à temperatura ambiente. Após as amostras foram centrifugadas em $12,000 \times g$ por 15 minutos a 4°C. O RNA total extraído foi lavado e eluído através do PureLink RNA Mini kit (Ambion, cat#12183020) e o tratamento dos resíduos de DNA foi realizado com o auxílio do kit DNase treatment (TURBO DNA-free™, Ambion, cat n°AM1907). Outra etapa de tratamento de resíduos de DNA foi realizada para a inativação de resíduos e a limpeza do conteúdo total de RNA através dos kits comerciais DNase inactivation and RNA Clean-up, respectivamente (Rneasy® mini kit, QIAGEN, cat#74104), conforme previamente descrito por Roquis et al. (2015).

A quantificação da expressão do gene 18S rRNA, considerado um gene de referência para estudos toxicológicos de parasitos, foi avaliada através do BioAnalyzer (Agilent) devido a possibilidade de baixa expressão deste gene nas amostras estudadas. Rotineiramente utilizado na análise da integridade de RNA, o BioAnalyzer é dotado de *chip* com matriz em gel aplicada em capilares, possibilitando a quantificação de diminutas concentrações de RNA (0,5-50µg) através da combinação de fluoróforos e marcadores de peso molecular. Tal combinação associada ao RNA resulta na emissão de fluorescência que pode ser quantificada, permitindo, dentre eles, a separação de 18S rRNA.

4.9. Análises estatísticas

Os resultados biológicos (reprodução, sobrevivência e desenvolvimento de vermes adultos) foram expressos em média e desvio padrão e submetidos ao teste Student's t ($\alpha = 5\%$) através do software R program (R Development Core Team, 2012). As figuras foram construídas através do software GraphPadPrism (GraphPad V.4.00, Prism, GraphPad, vol. 3.02 Prism Inc.). Dados proteômicos foram calculados através do software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, Suécia) pelo teste estatístico ANOVA com nível de significância de 0,05%. Dados de RNA-seq foram calculados através da plataforma Galaxy-IHPE pelo teste estatístico ANOVA com nível de significância de 0,05%.

5. RESULTADOS

5.1. Análises Parasitológicas e Ecológicas

A CL₅₀ do látex de *E. milii* determinada para moluscos *B. glabrata* foi estabelecida em 1,4 mg/L e concentração equivalente foi utilizada para a exposição de cercárias de *S. mansoni* ao longo de todo experimento. A infecção do hospedeiro definitivo com cercárias do grupo 1 em comparação à infecção com cercárias do grupo 2 alterou de maneira tênue a sobrevivência do hospedeiro definitivo (Tabela 1). Contudo, a exposição reduziu de maneira significativa o desenvolvimento e a razão sexual (machos e fêmeas) de parasitos adultos entre os grupos 1 e 2.

Foram recuperados, em média, 23,4±10,7 parasitos machos e 27,8±2,9 fêmeas adultas no grupo 1, enquanto que no grupo 2 foram encontradas 6,6±14,2 parasitos machos e 7,1±15,4 parasitos fêmeas. Tal redução de 71,7% em parasitos machos ($p<0,0001$) e 74,4% em fêmeas ($p<0,0001$) é estatisticamente significativa quando comparada aos seus respectivos controles (Tabela 1).

A taxa de infecção também apresentou alteração estatisticamente significativa entre parasitos machos e fêmeas dos grupos 1 e 2 ($p<0,0294$ para ambos). A taxa de infecção de parasitos machos foi de 31,2% e para parasitos fêmeas foi de 37,1% no grupo 1. Entretanto, no grupo 2, após a exposição de cercárias ao látex, observou-se taxa de infecção de apenas 8,8% e 9,5%, respectivamente (Figura 14). A exposição de cercárias ao látex de *E. milii* alterou a proporção sexual em virtude do aumento relativo de fêmeas de *S. mansoni* (Figuras 15-16). No grupo 1 a proporção sexual entre machos/fêmeas apresentou correlação positiva com o aumento da carga parasitária do hospedeiro definitivo sendo, em média, de 0,83±0,06, enquanto no grupo 2 não houve correlação entre a carga parasitária e a proporção sexual, sendo esta última, em média, de 0,93±0,03, um aumento de 10,75% na proporção sexual macho/fêmea. A atividade reprodutiva decorrente de tal fenômeno foi significativamente alterada quando comparados os grupos 1 e 2 (Tabela 1). O número de ovos detectados nas fezes de camundongos infectados com cercárias do grupo 2 87,5% menor em comparação aos camundongos infectados com cercárias do grupo 1. A atividade reprodutiva observada

em fêmeas de *S. mansoni* do grupo 1 foi, em média, de $5,0 \pm 0,1$ ovos postos enquanto parasitos fêmeas do grupo 2 foi de $3,2 \pm 2,3$ (Figura 17).

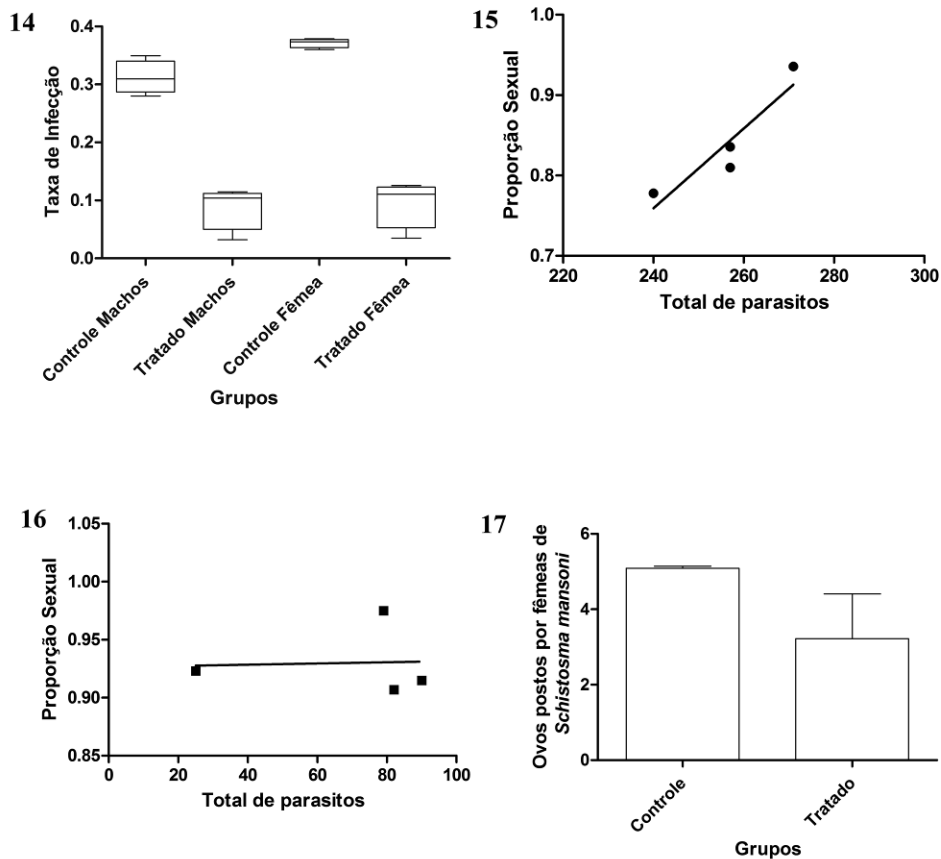


Figura 14. Taxa de infecção de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. Grupo 1 = controle machos e controle fêmeas; Grupo 2 = expostos machos e expostos fêmeas. Figura 15 e 16. Relação entre a proporção sexual (parasitos machos/parasitos fêmeas) com a carga parasitária de *S. mansoni* em camundongo Swiss Webster experimentalmente infectado. Figura 15. Regressão linear em espécimes do grupo 1; $R^2=0,85 - Y= 87,13+0,004x$. Figura 16. Regressão linear em espécimes do grupo 2; $R^2= 0,002 - Y= -1,7752+5,2E-005x$. Figura 17. Atividade reprodutiva de fêmeas de *S. mansoni*.

Tabela 5. Efeito da exposição de cercárias de *Schistosoma mansoni* à 1,4 mg/L do látex de *Euphorbia milii* pelo período de 1 hora

	Taxa de sobrevivência do OPG/ camundongo hospedeiro definitivo	Parasitas Machos	Parasitas Fêmeas	Parasitas totais	
Grupo 1*	83 %	141,6 ± 5,7 ^a	23,4 ± 10,7 ^a	27,8 ± 2,9 ^a	51,2 ± 12,6 ^a
Grupo 2**	97 %	17,6 ± 1,2 ^b	6,6 ± 14,2 ^b	7,1 ± 15,4 ^b	13,8 ± 29,6 ^b
p-valor	0,09	0,005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

*Grupo 1 = cercárias mantidas em água desclorada pelo período de uma hora.

**Grupo 2 = cercárias exposta à 1,4 mg/L do látex de *E. milii* pelo período de uma hora.

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre as médias ($\alpha = 5\%$)

5.2. Análises ultraestruturais de parasitos adultos de *Schistosoma mansoni*

Foram realizadas análises ultraestruturais por MEV comparando os adultos machos e fêmeas de *S. mansoni* dos grupos 1 e 2 para verificar possíveis alterações no tegumento.

A fêmea de *S. mansoni* possui corpo filiforme e alongado com tegumento liso, no entanto numerosas organelas sensoriais e pequenos espinhos são observados distribuídos ao longo da região mediana dorsal. Na fêmea adulta de *S. mansoni* do Grupo 1, as ventosas oral e ventral embora reduzidas estão bem delimitadas e com tegumento íntegro (Figura 18); no grupo 2, foram observadas deformações nas duas ventosas e forte alteração na superfície do tegumento enrugado (Figura 19). A região mediana do corpo não diferiu entre espécimes do grupo 1 e do grupo 2 (Figuras 20-21). A região posterior do corpo das fêmeas em ambos os grupos apresentou espinhos no corpo, sendo, no entanto, ausentes na porção terminal (Figuras 22-23).

Os adultos são monogâmicos e ocorre íntimo contato da fêmea com o canal ginecóforo do macho visando à reprodução (Figura 24). A ultraestrutura da região anterior dos machos de *S. mansoni* apresentou diferenças ultraestruturais entre os grupos. No grupo 1, as ventosas oral e ventral estavam bem delimitadas e com tegumento íntegro (Figura 25). Os espécimes do grupo 2 apresentaram deformações nas ventosas oral e ventral e o tegumento muito alterado com rugosidades (Figura 26). Na região média do corpo, observa-se no grupo 1 um nítido padrão de distribuição de tubérculos e espinhos e tegumento íntegro (Figuras 27, 29 e 31), entretanto nos espécimes do grupo 2 observam-se uma mudança deste padrão. As alterações observadas no grupo 2 incluem: desaparecimento dos tubérculos ou distribuição irregular na borda externa do canal ginecóforo dando lugar a um número excessivo de espinhos (Figura 28); na região dorsal do corpo, os tubérculos ocorrem de forma desordenada, entremeados por um grande número de espinhos (Figura 30) e deformidades severas onde os tubérculos aparecem extremamente reduzidos ou nem aparecem (Figura 32). A ultraestrutura do interior do canal ginecóforo no grupo 1 é constituída por inúmeros espinhos afilados, ordenados, entremeados com papilas sensoriais (Figura 33). Nos indivíduos do grupo 2 o tegumento do canal ginecóforo foi muito alterado com a perda total dos espinhos, restando tão somente as papilas sensoriais (Figura 34).

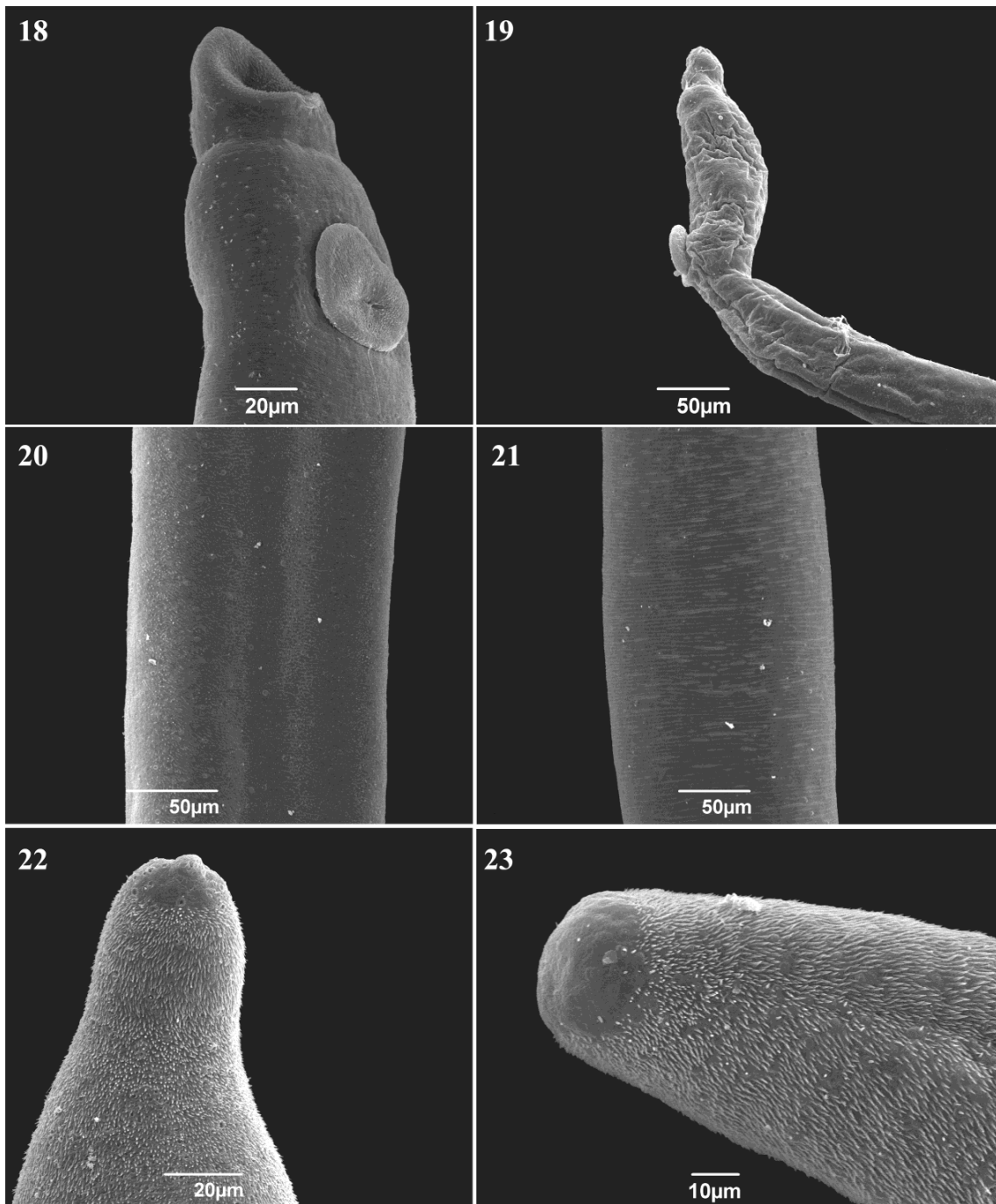


Figura 18-23: Microscopia eletrônica de varredura de fêmeas de *Schistosoma mansoni*. Figura 18. Formação de padrão de ventosas oral e ventral de fêmeas adultas do grupo 1 (barra = 20 μm). Figura 19. Rugas na região anterior do tegumento de fêmeas adultas do grupo 2 (barra = 50 μm). Figura 20. Seção mediana de fêmeas do grupo 1 (barra = 50 μm). Figura 21. Seção mediana de fêmeas do grupo 2 (barra = 50 μm). Figura 22. Seção posterior de fêmeas do grupo 1 (barra = 20 μm). Figura 23. Seção posterior de fêmeas do grupo 2 (barra = 10 μm).

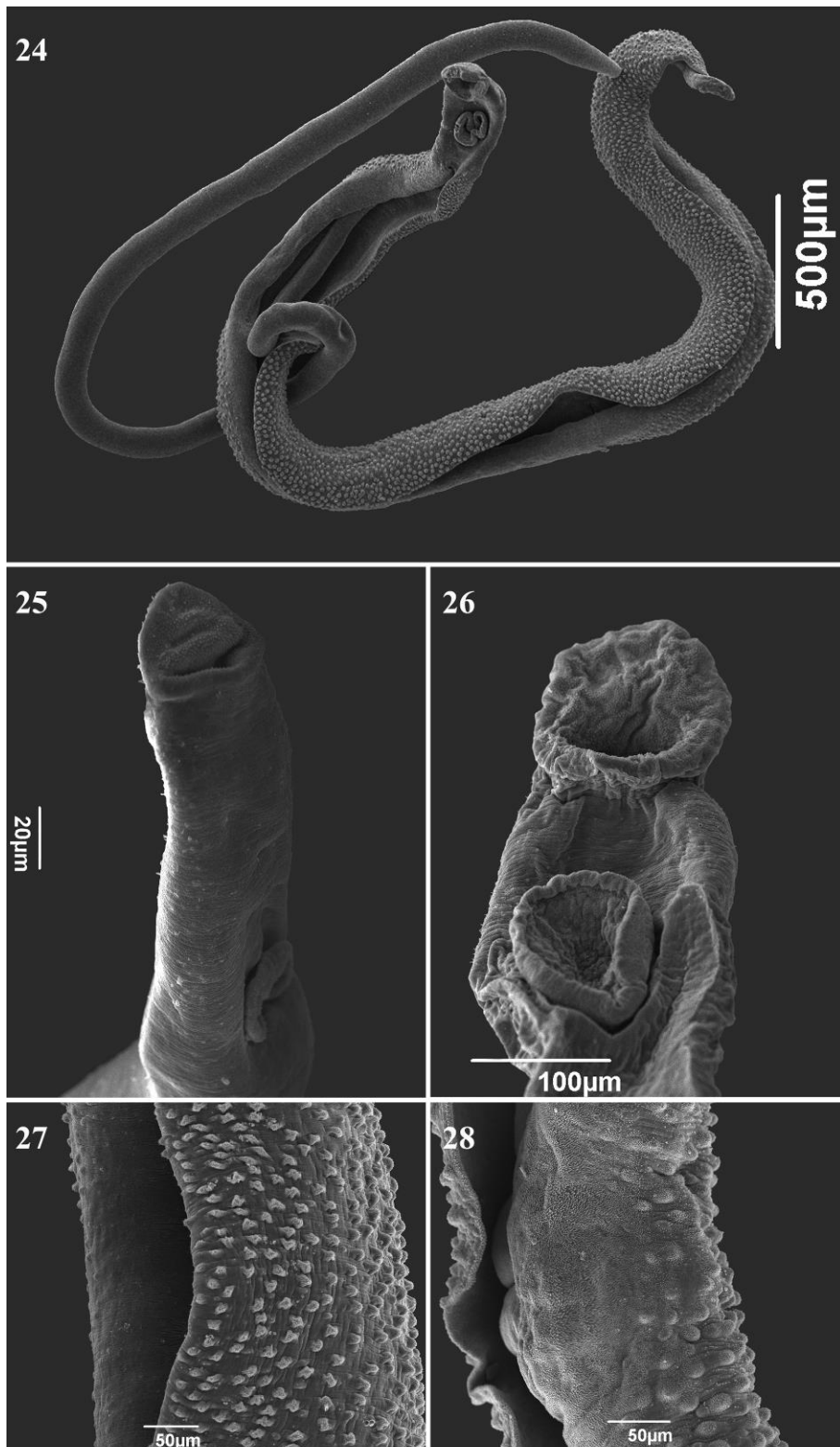


Figura 24-28: Microscopia eletrônica de varredura de *Schistosoma mansoni*. Figura 24. Casal parasitário formado por macho e fêmea do grupo 1 (barra = 500 µm). Figura 25. Seção anterior de machos do grupo 1 (barra = 20 µm). Figura 26. Seção anterior de machos do grupo 2 (barra = 100 µm). Figura 27. Seção anterior de machos do grupo 1 (barra = 50 µm). Figura 28. Seção anterior de machos do grupo 2 (barra = 50 µm).

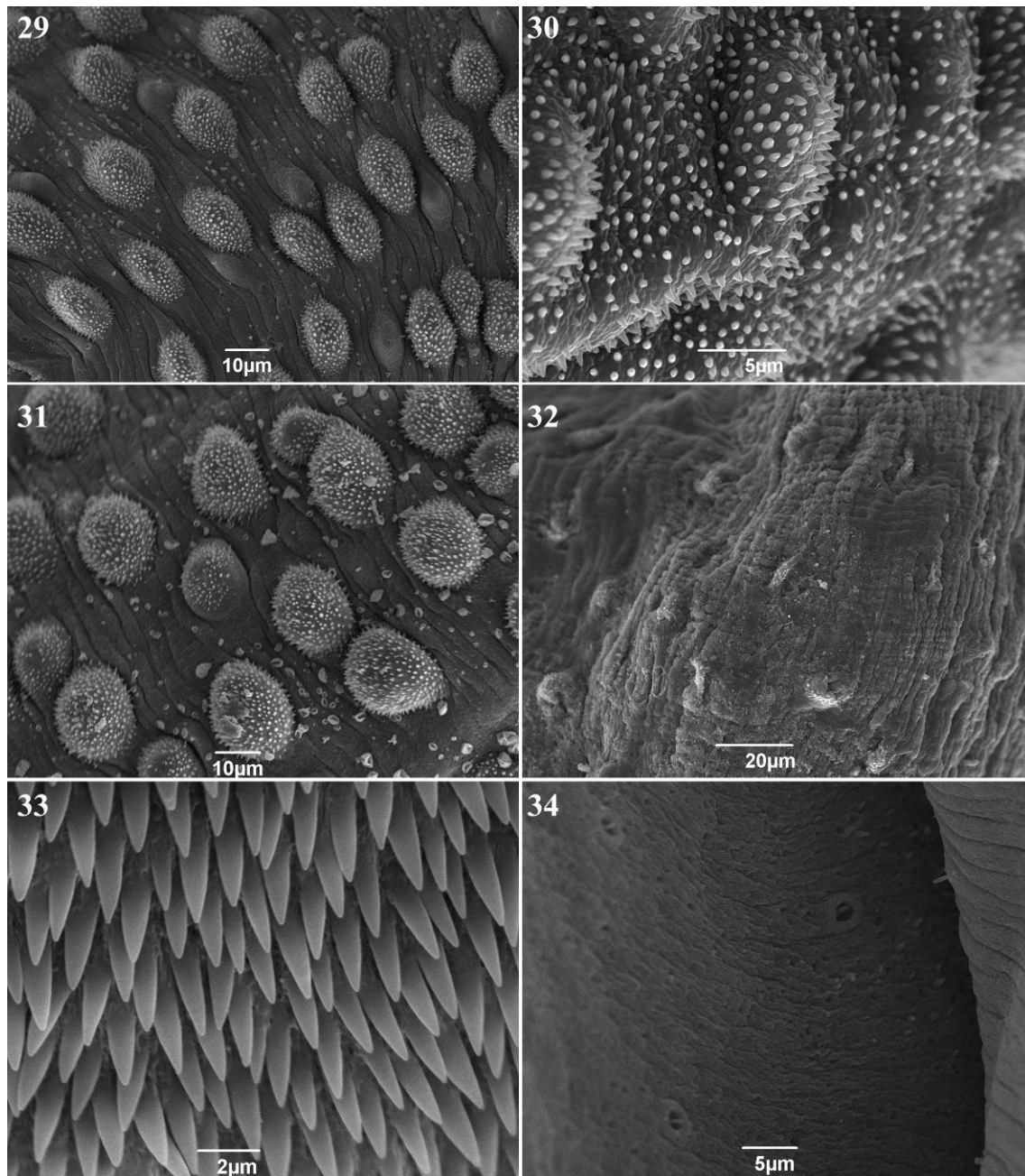


Figura 29-34: Microscopia eletrônica de varredura de machos de *Schistosoma mansoni*. Figura 29. Tegumento dorsal de machos do grupo 1 (barra = 10 µm). Figura 30. Tegumento dorsal de machos do grupo 2 (barra = 5 µm). Figura 31. Tubérculos de machos do grupo 1 (barra = 10 µm). Figura 32. Tegumento na seção dorsal de machos do grupo 2 (barra = 5 µm). Figura 33. Interior do canal ginecóforo de machos do grupo 1 (barra = 2 µm). Figura 34. Interior do canal ginecóforo de machos do grupo 2 (barra = 10 µm).

5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura associada a um Detector de Espectrometria de Energia Dispersiva (MEV-EDS).

Visando avaliar a composição de elementos químicos do látex de *E. milii*, sua possível toxicidade e bioacumulação, foi realizada uma análise semi-quantitativa do látex liofilizado e das camadas superficiais do tegumento de adultos *S. mansoni*. As análises foram realizadas pela reflectância do espectro de raio-X em sonda EDS (*Energy Dispersive System*) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura, tendo sido selecionados os elementos químicos N, Na, Mg, Al, K, Cr, Fe, Cu, Rh, Pd, Ag, Cd, Pt, Hg e Pb. A composição elementar do látex liofilizado (Figura 35) mostrou o peso atômico por cento (wt%) de K (45,14), Rh (31,39), Mg (11,45), Hg (2,58), Pt (2,24), Al (2,14), Na (2,03), Pb (1,85), Cu (0,47), Cd (0,42), Cr (0,25) e Fe (0,13). Dentre os elementos analisados, N, Pd e Ag estavam ausentes nas amostras testadas. A análise da composição elementar de espécimes machos adultos provenientes dos grupos 1 e 2 foram realizadas na região dorsal do corpo do parasito (Figuras 36-38) e o resultado de cada um dos 15 elementos analisados são apresentados em Tabela 2.

A análise comparativa realizada no tegumento de machos adultos dos grupos 1 e 2 mostrou que todos os elementos estavam presentes em ambos os grupos, exceto Pd que não foi detectado no grupo 2. Os níveis de metais alcalinos Na ($p < 0,008$), K ($p < 0,037$) e do metal alcalino-terroso Mg ($p < 0,025$) foram significativamente maiores no grupo 1. O não metal N foi significativamente mais abundante no grupo 2. As percentagens de Cr, Fe, Cu, Pt, H e Pb não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (Tabela 2).

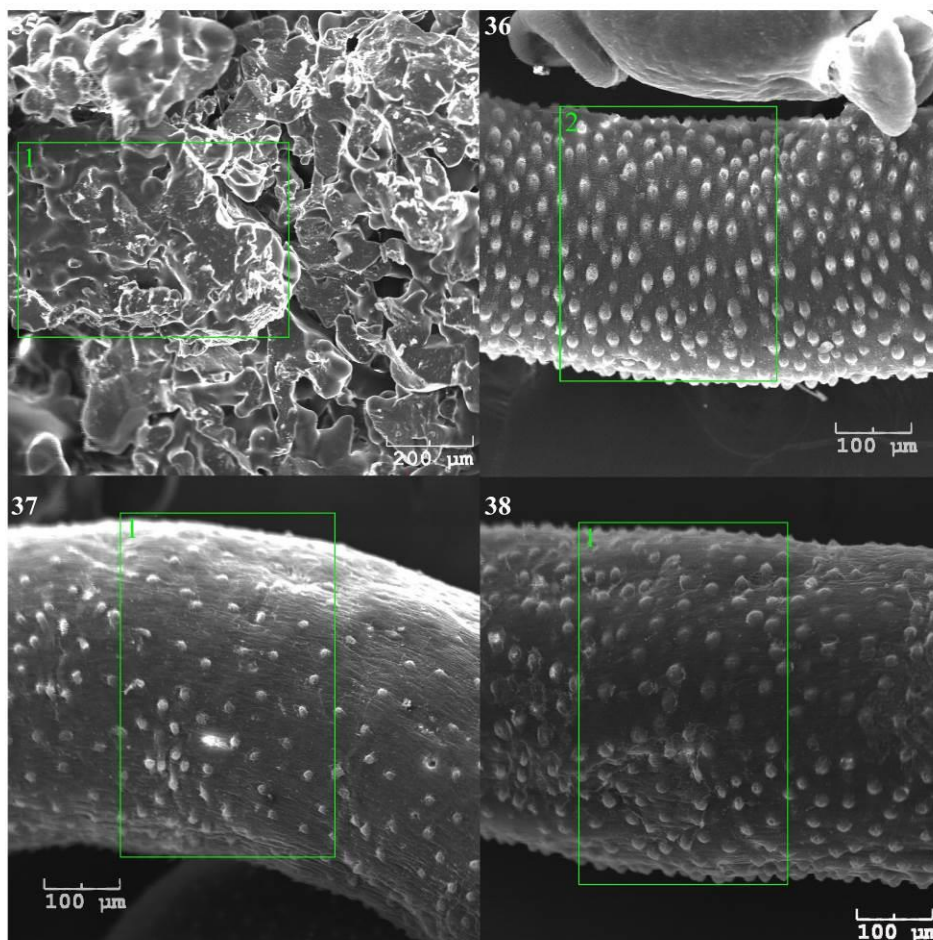


Figura 35 - 38: Ultraestrutura do látex liofilizado de *Euphorbia milii* var. *hislopii* e morfologia do tegumento de *Schistosoma mansoni* macho adulto. Figura 35. Látex liofilizado de *E. milii* (barra = 200 μm). Figura 36. Tegumento de adulto macho de *S. mansoni* do grupo 1 (barra = 100 μm). Figura 37-38. Tegumento de macho adulto de *S. mansoni* do grupo 2, mostrando intenso dano à superfície externa (barra = 100 μm). Os retângulos são referentes à área de análise.

Tabela 6. Concentração de elementos químicos no tegumento parasitos machos de *Schistosoma mansoni*.

Elementos	N		Na		Mg		Al		K		Cr		Fe		Cu	
Parasitos	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
1	6.9	35.0	23.2	17.0	14.6	10.8	13.5	9.2	1.6	0.8	0.2	0.2	0.9	0.8	13.0	12.2
2	15.2	39.5	20.8	14.9	14.3	11.6	14.4	10.4	1.2	0.5	0.2	0.1	0.6	0.5	12.6	8.8
3	23.4	31.5	20.4	13.3	13.33	8.2	10.0	5.6	0.9	0.9	0.1	0.3	0.8	1.1	17.8	21.4
4	30.1	41.8	17.4	12.7	11.1	9.9	10.3	9.0	0.9	0.6	0.1	0.1	0.7	0.9	11.8	10.7
Média	18.9±10.0	37.0±4.6	20.4±2.3	14.5±1.9	13.3±1.6	10.1±1.4	12.1±2.2	8.5±2.0	1.1±0.3	0.7±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0	0.7±0.1	0.8±0.2	13.8±2.6	13.3±5.5
p -valor	0.017		0.008		0.025		0.060		0.037		0.479		0.624		0.878	

Elemento	Rh		Pd		Ag		Cd		Pt		Hg		Pb	
Parasitos	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
1	11.3	3.6	0.6	0.0	0.8	0.000	0.614	0.000	3.423	3.674	3.472	2.680	5.322	3.59
2	9.78	6.3	0.7	0.0	1.1	0.213	0.000	0.000	3.077	1.876	2.845	2.634	2.806	2.09
3	1.3	1.6	0.0	0.0	0.0	0.000	0.000	0.242	3.768	4.794	4.146	5.428	3.606	5.15
4	7.4	5.2	0.0	0.0	0.3	0.108	0.000	0.000	3.137	2.581	3.553	2.783	2.664	3.07
Média	7.4±4.4	4.2±2.0	0.3±0.4	0.0±0.0	0.5±0.5	0.08±0.1	0.15±0.3	0.06±0.1	3.35±0.3	3.2±1.2	3.5±0.5	3.3±1.3	3.6±1.2	3.4±1.2
p -valor	0.227		-		0.091		0.593		0.861		0.872		0.898	

O grupo 1 está identificado como controle (C) e o grupo 2 como exposto (E). Os dados são expressos como média ± desvio padrão ($\alpha = 5\%$). N (Nitrogênio), Na (Sódio), Mg (Magnésio), Al (Alumínio), K (Potássio), Cr (Cromo), Fe (Ferro), Cu (Cobre), Rh (Ródio), Pd (Paládio), Ag (Prata), Cd (Cádmio), Pt (Platinum), Hg (Mercúrio) e Pb (Chumbo).

5.3. Análise Proteômica

A extração de proteínas de parasitos adultos foi realizada devido às alterações ultraestruturais, evidenciadas na superfície do tegumento. No entanto, a concentração de proteínas extraídas das fêmeas, 0,75 µg/µl por réplicas, não foi suficiente para a realização da análise proteômica. Nos machos, a concentração foi de 4,7 µg/µl por réplicas, sendo suficiente para prosseguir com as análises.

A eletroforese bidimensional utilizada para comparar os perfis de distribuição e detectar proteínas evidenciou de um total de 1.020 *spots* nos géis provenientes de machos adultos, sendo 579 *spots* no grupo 1 e 442 *spots* no grupo 2 (Anexo 2). A análise comparativa dos *spots* dos grupos 1 e 2 evidenciou 26 *spots* diferencialmente expressos, sendo todos excisados e tripsinizados (Anexo 3). As listas de picos gerados pelo espectrômetro MALDI-TOF/TOF foram analisadas e comparadas com as proteínas depositadas no banco de dados UniProtKB, específico para membros da família Schistosomatidae, com 11.723 sequencias de peptídeos e 5.597.432 resíduos em 08/12/2014, utilizando o algoritmo MASCOT.

Das listas geradas por MALDI-TOF/TOF, o resultado obtido pela busca no banco de dados possibilitou a identificação por PMF e/ ou MASCOT de 10 *spots* (Figuras 39 e 40) e sete proteínas: Actina, Troponina T, Tropomiosina, Paramiosina, hsp70 (*Heat Shock Protein 70*), 14-3-3 epsilon e Aldeído Desidrogenase (Tabela 3). Esses resultados foram em seguida estatisticamente validados pelo Scaffold e manualmente validados pelo Peaks (Tabela 3).

De acordo com anotações funcionais depositadas, as proteínas identificadas foram classificadas em oito funções biológicas: metabolismo energético (ATP) (30%), atividade estrutural (10%), contração do musculo esquelético (20%), ligação à calmodulina (10%), processos metabólicos (10%), atividade da oxireductase (10%) e atividade de NAD/NADH (10%) (Figura 41).

Utilizando o banco de dados STRING foi possível visualizar as redes de interação proteína-proteína nos componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas entre os parasitos do grupo 2

quando comparados com seus controles (grupo 1). Todas as sequencias peptídicas identificadas foram classificadas em cinco componentes celulares: fibra contrátil ($p=0,00000182$), citoesqueleto de actina ($p=0,000179$), membrana intracelular ($p=0,01$), citoplasma ($p=0,02$), complexo proteico ($p=0,03$) (Figura 42).

A interação de proteínas validadas manualmente e estatisticamente formou uma rede com coeficiente de aglomeração de 0,81 e $p=0,00026$, onde Smp_198290 (Paramiosina), Smp_046590 (Actina), Smp_179.810 (Troponina T), Smp_044010.2_mRNA (Tropomiosina-1) e Smp_106930 (Hsp70) interagiram formando uma rede e Smp_050390 (aldeído desidrogenase) e Smp_034840.2 (14-3-3 epsilon) não apresentaram correlação estatística com a rede apresentada (Figura 43).

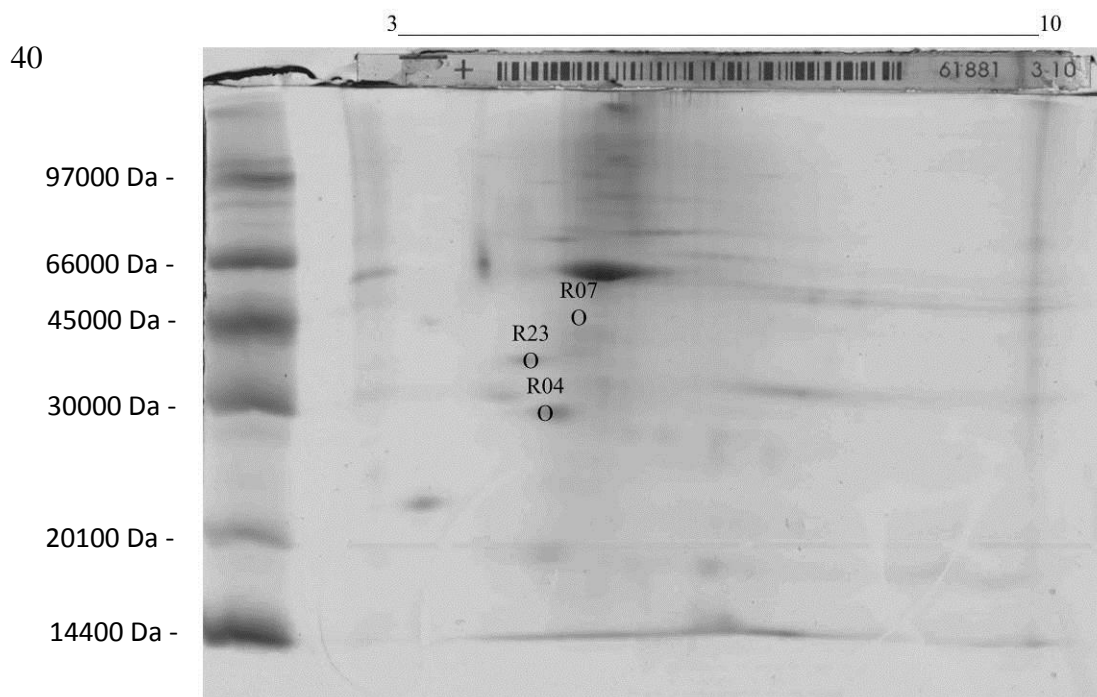
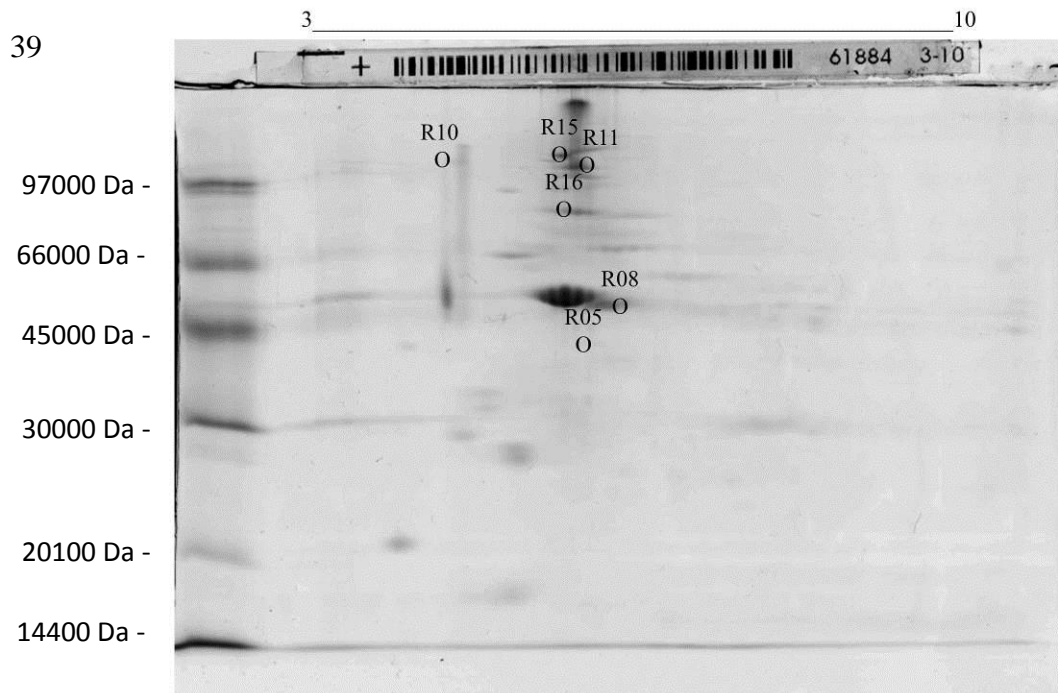
Dentre os 10 *spots* validados, cinco tiveram detecção exclusiva no grupo 1: Actina-R5, Troponina-R8, Tropomiosina-R10, Paramiosina-R11 e Paramiosina-R15.

Tabela 7. Proteínas diferencialmente expressas identificadas entre os espécimes de adultos machos de *Schistosoma mansoni* provenientes dos grupos 1 e 2, com número do *spot*, grandeza de expressão, análise de variância (ANOVA), identificação do gene pelo UniProtKB, sequência de peptídeos por PMF e Mascot, Mascot *score*, peso molecular (Mw) e ponto isoelétrico (PI).

Número do <i>Spot</i>	Proteína	Grandeza de expressão	Anova	Identificação do Gene para <i>Schistosoma mansoni</i>	Sequência de Peptídeos identificados por PMF	Sequência de Peptídeos identificados por Mascot	Mascot <i>Score</i>	Mw (Da)	PI
R04	Actina	-1.55154	0.0001	Smp_046590	-M.CVPK.H -.MCVPK.H + Oxidation (M) K.HTHWKTER.R R.ISEYVSK.C R.ISEYVSKCLR.L R.LKGTTALNSAISR.H	K.SYELPDGQVITIGNER.F	46	45865	5.90
R05	Actina	*	*	Smp_046590	-.QGVMVGMGQK.D + 2 Oxidation (M) K.DSYVGDEAQS.K R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A R.TTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR .L R.LDLAGR.D K.SYELPDGQVITIGNER.F	R.AVFPSIVGRPR.H K.SYELPDGQVITIGNER.F	55	45865	5.90
R07	Actina	-4.04487	0.0044	Smp_046590	Não identificado	R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A K.SYELPDGQVITIGNER.F	203	39311	5.03
R08	Troponina t,	*	*	Smp_179810	Não identificado	R.TVFTGANYAEEYQR.I	64	53951	5.6
R10	Tropomiosina	*	*	Smp_044010.2	Não identificado	K.ALEISEQESAQREESYEETIR.D	70	97815	4.5
R11	Paramiosina	*	*	Smp_0198290	M.NHDTESHVK.I R.HAADLGFQVDALSERLDEAGGSTTQTQE LLK.R K.SKFER.E K.TEEFEEMKR.K R.ITELEDTAERER.L K.LTLEIKDLQSEIESLSLENSELIR.R R.RVDELTIENVNTLTSQNSQLESENLR.L R.ENRQMNDQVK.E + Oxidation (M) R.KSTTR.T	R.VKDLETFLDEER.R R.VSELTIQVNTLTNDKR.R R.EITVKLEEAFAFATR.E	49	113247	5.4

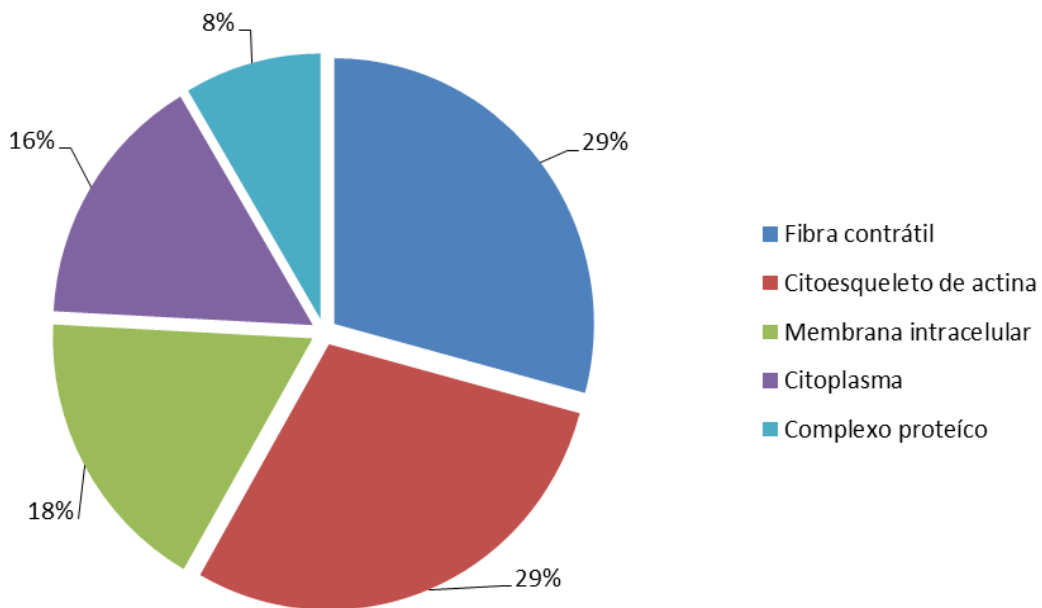
					K.RYESNIADLEIQDANK.A R.VKDLETFLDEER.R R.LQLANEIEEIRSTLENLER.L R.VSELTIQVNTLTNDKR.R R.EITVKLEEAFAFATR.E R.KFER.Q K.MKAYK.R + Oxidation (M)				
R15	Paramiosina	*	*	Smp_0198290	Não identificado	K.DLQSEIESLSLENSELIR.R	34	111600	5.5
R16	Heat shock protein 70	1.71381	0.0236	Smp_106930	Não identificado	R.ARFEELNADLFR.G R.FEELNADLFR.G	52	80012	5.9
R23	14-3-3 epsilon	-1.7373	0.0304	Smp_034840.2	Não identificado	R.VFSAVEQTEGNR.G K.FREVESELDR.V K.DILELIDKYLK.S R.YMAEFSVDPQR.K + Oxidation (M) K.AYQEASEIAATQLFPTHPIR.L K.FREVESELDR.V	198	32042	5.0
R25	Aldeído desidrogenase	-1.86281	0.0506	Smp_050390	R.IRQLEDELESTETR.L R.QLEDELESTETR.L R.TFADEER.I R.TFADEERINQLEELK.E R.INQLEELK.E R.INQLEELKESTFMAEDADR.K + Oxidation (M) K.ESTFMAEDADR.K + Oxidation (M) K.YDEAARK.L K.LAITEVELER.A K.ITELEELR.I K.SLEISEQEAQR.E K.SLEISEQEAQREEAYEENIR.D R.EEAYEENIR.D R.EEAYEENIRDALTER.L R.LVNTLQADADRLEDELVTEK.E	30	54412	5.76	

*Spots exclusivamente identificados em espécimes do grupo 1 (grupo controle). UniProtKB - The Universal Protein Resource Knowledgebase.
Da – Daltons.



Figuras 39 e 40: Eletroforese bidimensional de machos adultos de *Schistosoma mansoni* realizada em fitas de sete centímetros de gradiente imobilizado (pH 3-10) e coradas com Azul de Coomassie G-250 dos grupos 1 e 2, respectivamente. Figura 41. Ontologia gênica através do STRING software. A análise dos componentes celulares de dez sequências peptídicas válidas de machos adultos de *S. mansoni* do Grupo 1 e do Grupo 2.

41



42

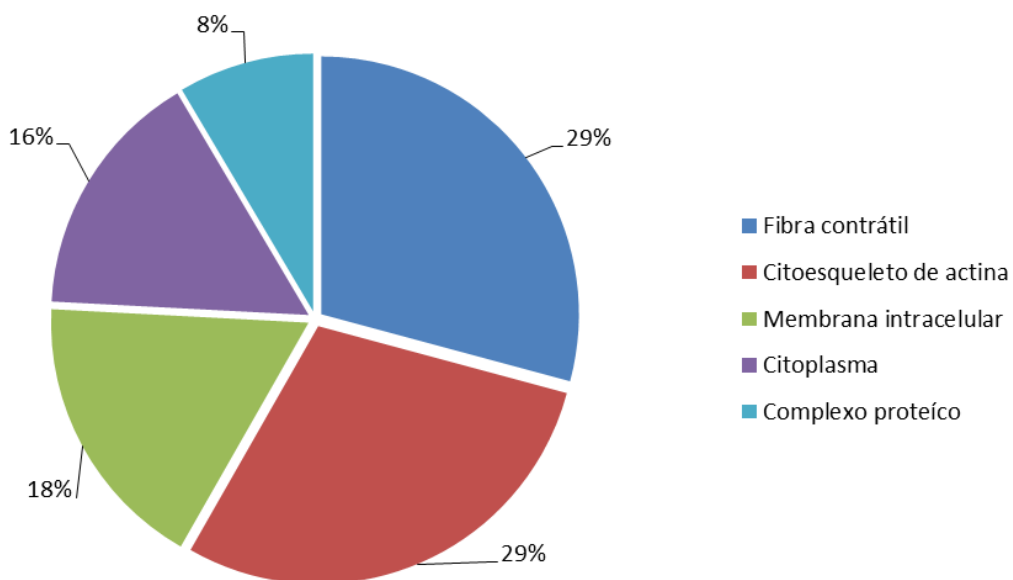


Figura 41 e 42: Ontologia gênica através da STRING software. Figura 41. Análise das funções moleculares de dez sequencias peptídicas válidas de machos adultos de *Schistosoma mansoni* dos grupos 1 e do grupo 2. Figura 42. Análise dos componentes celulares de dez sequencias peptídicas válidas de machos adultos de *S. mansoni* dos grupos 1 e 2 .

43

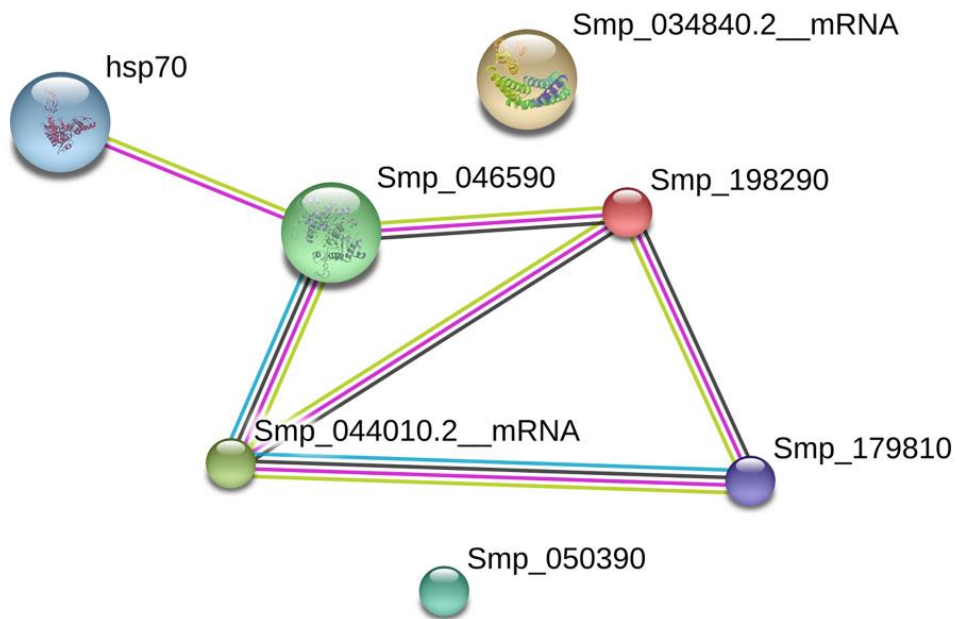


Figura 43. Rede de interação gênica de proteínas de *Schistosoma mansoni* diferencialmente expressas entre espécimes dos grupos 1 e 2.

Embora o *spot* da Actina-R5 só tenha sido identificado nas réplicas técnicas de parasitos do grupo 1, outras sequências de peptídeos identificadas como Actina foram detectadas em réplicas técnicas de parasitos do grupo 2. Quanto aos *spots* identificados concomitantemente em géis dos grupos 1 e 2, R04, R07, R23 e R25 foram estatisticamente menos expressos em indivíduos do grupo 2, com valores de -1,55, -4,04, -1,73 e -1,86, respectivamente.

Utilizando o banco de dados STRING foi possível prever as possíveis rotas metabólicas afetadas em machos de *S. mansoni* provenientes de cercárias expostas ao látex de *E. milii*. Assim, a partir dos parâmetros selecionados, quatro redes de interação com 10 rotas metabólicas foram observadas: glicólise/glicogenólise ($p=0,00016$), metabolismo do piruvato ($p=0,00027$), metabolismo de histidina ($p=0,0005$), degradação de ácidos graxos ($p=0,00075$), interconversão de pentose e glucoronato ($p=0,0016$), metabolismo do triptofano ($p=0,0025$), metabolismo do propanoato ($p=0,0038$), metabolismo do glicerolípido ($p=0,0067$), metabolismo de arginina e prolina ($p=0,0075$) e processamento de proteínas no retículo endoplasmático ($p=0,0093$) (Tabela 4).

As redes preditas apresentaram no total 27 proteínas, 43 interações, coeficiente de aglomeração de 0,77 e $p=0,00013$ (Figuras 44). A proteína hsp70 figura em posição de destaque interagindo com nove proteínas de sua rede, sendo Paramiosina (Smp_198290) uma interação indireta através da proteína hsp70 (Smp_072330.2_mRNA). Em outra rede, as proteínas Troponina T (Smp_179810) e Tropomiosina (Smp_044010.2_mRNA) interagem com duas isoformas de Troponinas preditas (Smp_059170.2_mRNA e 018250.2_mRNA). A proteína Actina (Smp_046590) apresenta posição de destaque em uma distinta rede com cinco interações com proteínas preditas (Smp_073940, Smp_195080, Smp_181350, Smp_149130). Aldeído desidrogenase (Smp_050390) interage em sua rede com outras quatro proteínas não identificadas no presente estudo (Smp_044440, Smp_017610, Smp_053220.1_mRNA, Smp_168520).

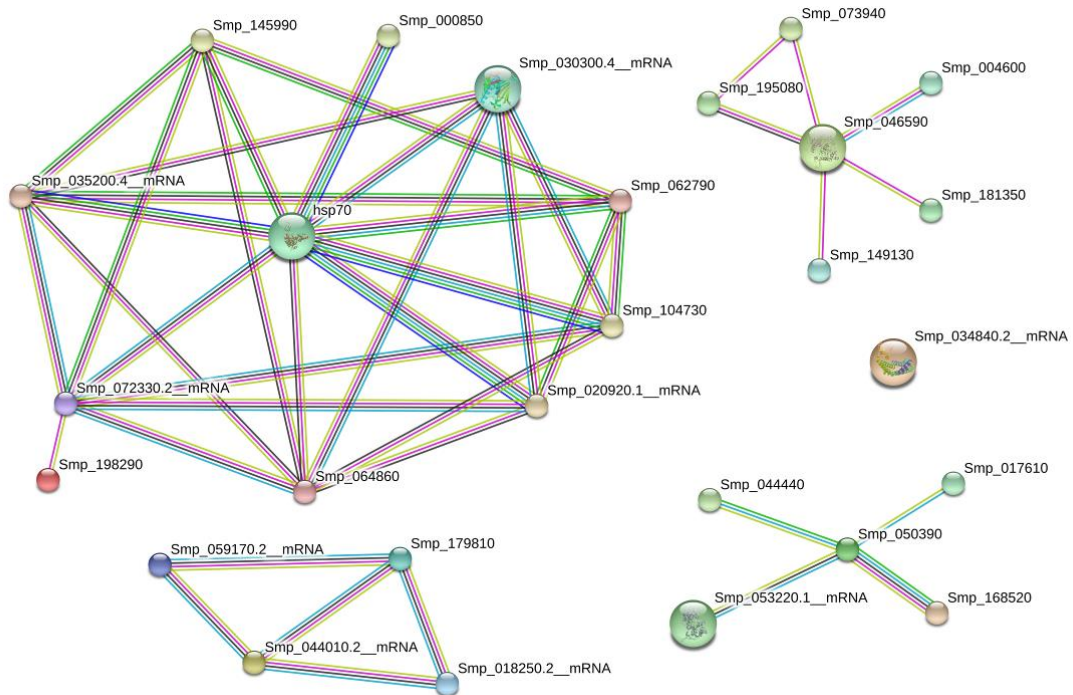


Figura 44. Rede preditiva de interação gênica de proteínas de *Schistosoma mansoni*. A especificidade utilizada para a construção dessa rede foi: maior confiança (score >0,9) e não mais de 20 interações proteína-proteína.

Tabela 4. Rotas metabólicas previstas em espécimes de adultos machos de *Schistosoma mansoni*.

	Identificação da rota metabólica	Rota metabólica	Nº de genes relacionados	P-valor
↑	4141	Processamento de proteínas no retículo endoplasmático	3	9.38E-4
	10	Glicólise / gluconeogênese	3	1.61E-5
	620	Metabolismo do piruvato	3	2.7E-5
	340	Metabolismo histidina	2	5.05E-5
↓	71	Degradação de ácidos graxos	2	7.56E-5
	40	Interconversão de pentose e glucoronato	2	1.06E-4
	380	Metabolismo do triptofano	2	2.25E-4
	640	Metabolismo propanoato	2	3.89E-4
	561	Metabolismo glicerolípido	2	6.75E-4
	330	Arginina e prolina metabolismo	2	7.58E-4

As setas indicam aumento (↑) e redução (↓) de atividade de rotas metabólicas. A identificação da rota metabólica foi evidenciada por KEGG Pathway e a organização das redes de interação, número de genes relacionados e p-valor na base de dados do STRING.

5.4. Quantificação do gene 18S rRNA

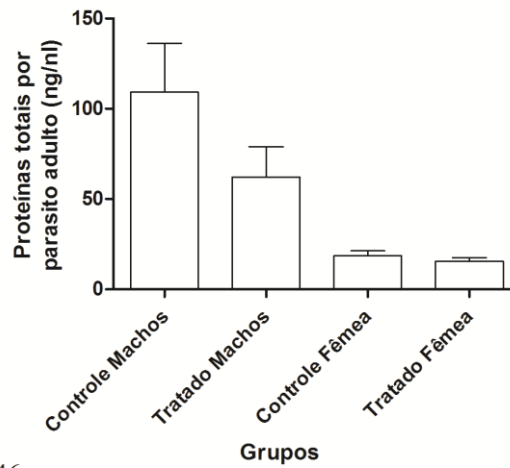
Uma análise complementar foi realizada na Université de Perpignan com moluscos e parasitos de mesma linhagem, Belo Horizonte – BH e *SmLE*. Nesta fase foi possível verificar que concentração de proteínas totais por parasito do grupo 1 foi de $109,2 \pm 54,4$ para machos e $18,6 \pm 5,6$ para fêmeas e no grupo 2 de $62,1 \pm 37,7$ para machos e $15,2 \pm 4,9$ para fêmeas, com uma redução na concentração de proteínas totais do grupo exposto de 43% e 18,2%, respectivamente.

Tendo em vista a diferença de perfis proteicos observados entre os grupos 1 e 2, foram realizadas quantificações do RNA total e do gene 18S rRNA, gene utilizado para estudos toxicológicos em parasitologia.

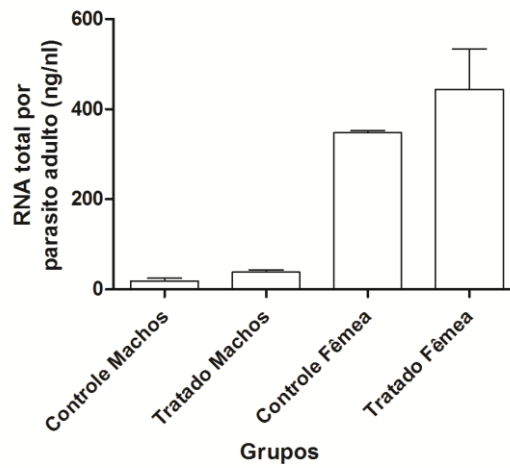
Foi detectado significativo aumento na expressão de RNA total em parasitos provenientes de cercárias expostas ao látex de *E. milii*. A concentração de RNA total por parasito do grupo 1 foi de $18,5 \pm 8,8$ para machos e $347,8 \pm 7,0$ para fêmeas e no grupo 2 de $38,2 \pm 7,1$ para machos e $443,7 \pm 126,9$ para fêmeas, conferindo um aumento de 51,5% nos machos e 21,6% nas fêmeas. O perfil antagônico entre o aumento na concentração de RNA total em espécimes do grupo 2, com nítida redução na concentração de proteínas totais por parasito pode ser observado nas figuras 45 e 46

De modo semelhante, houve aumento na concentração do gene 18S rRNA no grupo exposto. Em espécimes do grupo 1 a concentração foi de $4,5 \pm 0,7$ para machos e $2,9 \pm 1$, para fêmeas e no grupo 2 de $27,4 \pm 15,2$ para machos e de $4,2 \pm 2,6$ para fêmeas, um aumento de 83,5% nos machos e 30,9% nas fêmeas (Figuras 47).

45



46



47

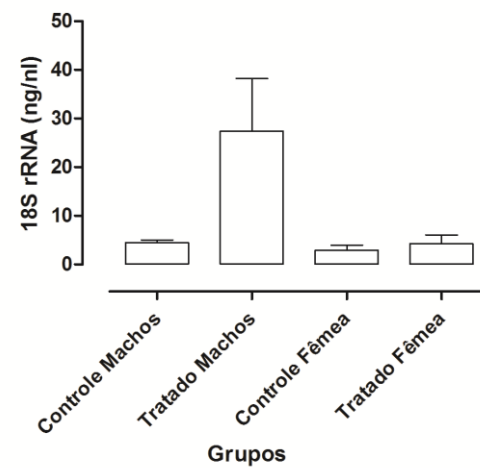


Figura 45. Concentração de proteínas totais de *Schistosoma mansoni* entre espécimes machos e fêmeas dos grupos 1 e 2. Figura 46. Concentração de RNA total de *S. mansoni* entre espécimes machos e fêmeas dos grupos 1 e 2. Figura 47. Concentração de 18S RNA de *S. mansoni* entre espécimes machos e fêmeas dos grupos 1 e 2.

6. DISCUSSÃO

Parasitos interagem de maneira complexa a distintos fatores de estresse e as alterações bióticas e abióticas do ambiente são determinantes no processo de desenvolvimento do parasito por influenciar o equilíbrio da relação parasito-hospedeiro (Lazzaro & Little 2009; Wolinska & King 2009).

Estudos sobre a alteração da qualidade ambiental na dinâmica de doenças infecciosas têm estado em destaque nos últimos anos, sendo a presença de poluentes em corpos hídricos e o aumento da temperatura climática, os temas mais abordados (Daszak et al., 2000; Jones et al., 2008; Sorci et al., 2013; Paaijmans et al., 2010). Em determinados casos, a presença de contaminantes ambientais pode aumentar a prevalência de doenças devido ao aumento da susceptibilidade do hospedeiro ou aumento da abundância de hospedeiros intermediários e vetores (Lafferty & Kuris 1999). Contrariamente, compostos também podem diminuir o parasitismo devido à susceptibilidade de larvas ou vetores ao composto apresentado, sendo a intensidade dos efeitos sobre a dinâmica parasitária dependente da interação parasito-hospedeiro (Lafferty & Kuris 1999).

Atualmente o uso de moluscicidas para o controle de moluscos hospedeiros intermediários, em foco epidemiológico, para a esquistossomose no Brasil é uma determinação do Plano Estratégico para Controle de Doenças Negligenciadas 2012-2020 (WHO, 2014) e entre as possibilidades, o látex *E. millii* se apresenta como um produto viável e extensivamente estudado como agente moluscicida (Schall et al, 1998; Lima et al., 2012; Augusto et al, 2015). Membros da família Euphorbiaceae apresentam em seus metabólitos secundários diterpenos, triterpenos, flavonóides, saponinas, taninos, alcalóides, ésteres, fenóis e rícino (Mwine & Damme, 2011) sendo suas principais aplicações médicas recomendadas à ação antibacteriana, atividade citotóxica e anti-inflamatória. No campo específico da parasitologia, as aplicações contra malária, parasitos intestinais, nematóides de vida livre, inseticida e moluscicida são as mais recorrentes (Mwine & Damme, 2011; Lirio et al., 1998; Shi et al., 2008; Singla & Pathak, 1990; Vlietink, 1987; Jain, 1996; Bhatnagar et al., 2000). Além dos compostos supracitados, no presente estudo foi identificada a presença dos metais tóxicos como Al, Pt, Hg e Rh no látex liofilizado de *E. milli*. Segundo Buron et al. (2009), a bioacumulação de metais em helmintos é um fenômeno bem caracterizado e pode ser influenciada pela natureza do próprio metal e pelo estágio de desenvolvimento do parasito ou do hospedeiro parasitado.

Neste sentido, o uso de compostos solúveis, como o látex de *E. milii*, em sítios epidemiologicamente ativos de esquistossomose pode afetar a dinâmica parasitária para além da redução dos estoques malacológicos. No tangente ao *S. mansoni*, a disposição do presente composto na água deve ser considerada como um fator de estresse químico, podendo alterar o comportamento e a expressão do genoma do parasito de maneira pontual ou duradoura, assim como observado com poluentes industriais, metais pesados e agrotóxicos (Feil & Fraga 2012; Roquis et al., 2015). Tal fato deve-se a permeabilidade do glicocálix, que amplia a compreensão para além dos efeitos moluscidas desse, e de outros produtos veiculados à água. Como observado por Thornhil et al. (2009), a entrada de macromoléculas solúveis na água em cercárias de *S. mansoni* pode acarretar efeitos no desenvolvimento do parasito no hospedeiro definitivo à depender da natureza do composto utilizado. De-Carvalho et al. (1998), expuseram cercárias de *S. mansoni* ao látex de *E. milii* em concentrações elevadas (10-100 mg/L, durante 2 horas) e não observaram alterações nas taxas de sobrevivência e viabilidade das cercárias, entretanto Bakry & Mohamed (2011), expondo caramujos infectados ao mesmo produto, observaram redução na produção de cercárias e de vermes adultos, utilizando uma concentração 73,6% maior que a utilizada na presente Tese.

No presente trabalho foi observada a influência de um produto natural veiculado, através do meio aquoso, em cercárias de *S. mansoni* e suas consequências na taxa de infecção, proporção sexual, viabilidade dos ovos, alterações dos elementos químicos e ultraestruturais do tegumento e na expressão de proteínas de parasitos adultos. Tendo em vista a padronização das ações do Plano Estratégico para Controle de Doenças Negligenciadas 2012-2020 e a diversidade dos ambientes límnicos, onde ocorre o ciclo da esquistossomose, o presente estudo ressalta a importância do estudo da dinâmica da esquistossomose de maneira particular, pois distintos condicionantes ambientais podem afetar de maneira significativa, os resultados das ações de controle.

Após a exposição das cercárias de *S. mansoni* a concentração 1,4 mg/L do látex de *E. milii* pelo período de uma hora, foi observada significativa redução na taxa de infecção, variando entre 30-40% no grupo 1 para 10% no grupo 2. Segundo Lenzi et al. (2008), esta taxa pode variar de acordo com o modelo animal, tempo de infecção, carga do inóculo e método de perfusão, sendo aceito valor médio de 22,6%. Bakry & Mohamed (2011) utilizando o modelo *S. mansoni* (Ehrenberg, 1831) observaram taxa de infecção de 7,25% em cercárias expostas ao látex de *E. milii* à concentração de 8 ppm.

Segundo Boissier & Moné (2001), a alta competência infectante (taxa de infecção) de cercárias está associada a altas cargas parasitárias, aumentando assim, a

patogenicidade da infecção devido ao grande número de ovos eliminados pelas fêmeas sexualmente ativas. Ao comparar infecções experimentais em hospedeiros distintos, como roedores e primatas, observa-se o aumento na patogenicidade em primatas devido à grande carga parasitária e produção de ovos pelas fêmeas de *S. mansoni* no hospedeiro definitivo (Damian & Chapman, 1983; Sturrock et al., 1984). Combes & Poulin (1999) definem por virulência a capacidade de multiplicação de um determinado agente patogênico e de geração de dano ao seu hospedeiro, e neste sentido, a exposição de cercárias ao látex de *E. milii* tem ação direta na virulência de *S. mansoni* por alterar a taxa de infecção, o número de parasitos adultos e o número de ovos eliminados pelas fêmeas, em infecções experimentais.

A proporção sexual entre machos e fêmeas em uma população é um parâmetro demográfico importante e se apresenta como um conceito central da evolução por seleção sexual, estimando a intensidade e direção na concorrência entre parceiros durante o acasalamento (Kvarnemo & Ahnesjö, 1996). Em populações naturais de *S. mansoni*, a proporção entre os sexos oscila em torno de um equilíbrio de 1:1 (Hardy, 2002). No entanto, em hospedeiros definitivos experimentalmente infectados por *S. mansoni* observa-se, de maneira geral, um maior número de parasitos machos.

Segundo Beltran & Boissier (2010), a proporção sexual com tendência a maior ocorrência de machos em populações de *S. mansoni* pode ser influenciada por fatores ambientais e/ou fatores genéticos. Segundo os autores, a tendência ao macho se origina no hospedeiro vertebrado por volta do 25º dia e pode ser explicada por duas hipóteses: (i) a perda de fêmeas durante a migração para as veias mesentéricas, em virtude do fluxo sanguíneo, devido a sua anatomia e (ii) o aumento do número de machos cria um cenário com mais opções para o acasalamento, ampliando a competição e a variabilidade genética. Ainda de acordo com os autores, em 616 experimentos independentes, observou-se em 75% destes apresentaram uma tendência a maior na proporção de machos, entretanto, no presente modelo foi observada maior quantidade de fêmeas tanto em populações do grupo 1, quanto do grupo 2. Os parâmetros de taxa de infecção (infectividade) e proporção sexual para machos são fenômenos dependentes, onde o aumento de parasitos adultos no hospedeiro definitivo acompanha o aumento da proporção de machos em relação às fêmeas (Popiel, 1986; Haseeb & Eveland, 1991; Schussler et al., 1997; Beltran & Moné, 2010). Observamos tal comportamento entre as taxas de infecção e a proporção de machos adultos do grupo 1, ou seja, do grupo controle. No entanto, este comportamento não se confirma no grupo 2, onde o número de fêmeas na proporção sexual se mantém inalterado em função do aumento da taxa de infecção.

Segundo Beltran & Moné (2010), a maior proporção de fêmeas é observada nas infecções em hospedeiros pouco permissivos, alopatría e/ou situações de estresse ambiental, como é o caso do látex de *E. milii*.

A atividade reprodutiva reduziu significativamente em fêmeas oriundas de cercárias de *S. mansoni* expostas ao látex de *E. milii* quando comparada a fêmeas do grupo controle. Tais resultados corroboram com Bakry & Mohamed (2011), onde a atividade reprodutiva de parasitos adultos provenientes de moluscos *B. alexandrina* expostos ao látex de *E. milii* também foi significativamente reduzida.

O tegumento de *S. mansoni* é uma estrutura multifuncional e apresenta importância vital para os parasitos adultos (Xavier et al., 2010). Devido a sua interface com o hospedeiro definitivo, essa estrutura está intimamente associada a absorção de nutrientes e eliminação de produtos de excreção, estando em contato direto com o sistema imune do hospedeiro. O tegumento do parasito apresenta um processo de renovação constante na zona exterior de sincício (Shuhua et al., 2000; Faghiri et al., 2010). Quando exposto a drogas anti-helmínticas (Hicantone, Oxamniquine, Praziquantel®, etc.), deformações locais no tegumento como enrugamentos, erosão e perda de tubérculos são observadas (Shuhua et al., 2000; Manneck et al., 2010). Levando-se em conta que entre o período de exposição das cercárias ao látex até a fase adulta, quando foram observados os efeitos no tegumento, o parasito passou por intensas modificações, referidas por Stirewalt (1974) como perda do glicocálix, alteração do tegumento trilaminar para heptalaminar, migração para coração, pulmão, veia porta hepática até a fase de formação de casais. Em nosso modelo, cercárias mesmo submetidas a doses subletais do látex de *E. milii*, apresentaram após 60 dias de infecção, grandes alterações no tegumento de parasitos do grupo 2, tais como a redução dos tubérculos e espinhos. Resultados similares foram referidos no tegumento do macho de *S. mansoni* expostos ao Praziquantel®, Artemether e ao látex de Allicin (Liang et al., 2010; Xiao et al., 2002; Lima et al., 2012), drogas esquistossomicidas utilizadas no controle da parasitemia.

Paralelamente, após os 60 dias de infecção também foram observadas por MEV-EDS, alterações na concentração de elementos inorgânicos no tegumento de *S. mansoni*. No caso, onde as cercárias de *S. mansoni* foram expostas ao látex, foram produzidos efeitos nos parasitos adultos, sugerindo que estas alterações químicas podem passar através de diferentes estádios de vida, desde o ambiente até o hospedeiro definitivo.

Este é o primeiro trabalho a descrever os elementos químicos presentes no látex de *E. milii* var. *hislopii*. Metais tóxicos como Al, Pt, Hg e Rh foram encontrados no látex,

sendo este último mais abundante (31,39%). A ocorrência do Rh é rara, sendo encontrado no ambiente como resíduo de medicações anti-cancerígenas ou emitido por catalizadores de automóveis (Sures et al., 2003; Singer et al., 2005). No nosso estudo, o Rh mesmo em altas concentrações no látex não acumulou de modo significativo no grupo 2 (4,2%) quando comparado com o grupo 1(7,4%). No látex, a porcentagem de Al, Cu, Pb foram baixas em relação ao grupo controle e ao grupo 2, conforme observado na Tabela 2. Morais & Malta (2014) também observaram Cu, Pb e Al, entre outros elementos, em diferentes metacercárias de digenéticos de peixes capturados em igarapés poluídos na região de Manaus, AM, Brasil. Embora eles tenham correlacionado a presença destes metais com efluentes tóxicos originários do distrito industrial de Manaus, é interessante notar que Cu, Pb e Al estavam presentes tanto no grupo controle quanto no grupo 2, provavelmente indicando que estes elementos possam ocorrer em diferentes espécies de digenéticos.

Outros elementos como Cd e Al foram encontrados em baixas concentrações no tegumento dos parasitos e o Pd foi detectado somente no grupo controle. Embora as funções biológicas destes elementos sejam pouco estudadas, sabe-se que são tóxicos em altas concentrações, mas essenciais para a vida em pequenas quantidades (Morley et al., 2002). De acordo com Sigel et al. (2009), a proteína metalotioneína (MT) atua na proteção de células contra oxidante reativos, incluindo óxido nítrico que possui a capacidade de se ligar a metais pesados como Cu, Cd e Ag. González-Mejia et al. (2014), referiram que o radical de óxido nítrico tem uma atividade biológica limitando inflamações locais causadas por parasitos. A redução do Cd, Al, Rh e Ag no grupo 2 em relação à proteção da MT contra a esquistossomose, ainda necessita ser avaliada.

Shaw & Erasmus (1984) também avaliaram a presença de oito elementos químicos no tegumento normal do macho de *S. mansoni* por microanálise usando sonda X-Ray. Os autores observaram elevadas concentrações de K e baixas concentrações de Na, Fe e Mg, respectivamente. Em nosso estudo, o grupo controle (grupo 1) apresentou valores mais elevados de Na e Mg e baixos valores de K e Fe. De acordo com Shaw & Erasmus (1984), os valores de peso atômico por cento (wt%) podem variar entre as linhagens de parasitos e hospedeiros infectados, método de fixação e preparação da amostra e o estado metabólico/fisiológico dos parasitos.

Quando comparamos a composição elementar entre espécimes machos do grupo 1 e do grupo 2 observamos diferenças significativas com níveis mais elevados de Na⁺, Mg²⁺ e K⁺ no grupo de controle e N no grupo 2, oriundo de cercárias expostas ao látex. Segundo Smyth & Halton (1983), o tegumento de *S. mansoni* é principalmente

dependente de gradientes de K^+ e Na^+ , responsáveis pela despolarização parcial das membranas de superfície que induz as contrações musculares dos parasitos. Comparando os elementos químicos presentes no látex com ambos os grupos de *S.mansoni* machos (1 e 2), observou-se uma grande quantidade de K^+ no látex liofilizado (45,14 wt%) e uma percentagem baixa nos grupos 1 e 2 (1,1 e 0,7 wt%). Entretanto significativa ($p = 0,008$) redução de Na ocorreu entre os parasitos do grupo controle (20,4 wt%) e o grupo 2 (14,5 wt%). No presente trabalho não foram observadas alterações na contração muscular dos parasitos adultos vivos, de acordo com a proporção dos íons K^+ e Na^+ que se mantiveram regulares. Deste modo, o látex não influenciou na bomba de Na^+ e K^+ .

Galaktionov & Dobrovolskij (2003) descreveram que o conteúdo da vesícula excretora de trematódeos também inclui cálcio (Ca), magnésio (Mg) e fósforo (P). No grupo controle o Mg^{2+} foi significativamente mais abundante (13,3 wt%) quando comparado ao grupo 2 (10,1 wt%). A alteração nos níveis de Mg pode estar relacionada com a osmoregulação dos parasitos e também na contração muscular em conjunto com Na^+ e K^+ (Galaktionov & Dobrovolskij 2003).

O tegumento de *S. mansoni* renova constantemente a camada externa do sincício adaptando-se as condições imunofisiológicas do hospedeiro (Faghiri et al., 2010). Paralelamente, o parasito apresenta uma capacidade de mimetismo, incorporando antígenos de superfície do próprio hospedeiro no tegumento, a fim de escapar das ações do sistema imune. As mudanças no peso atômico por cento da composição dos elementos inorgânicos do tegumento de *S. mansoni* pode estar envolvida nas mudanças morfológicas observadas no grupo 2. Estas alterações morfológicas podem enfraquecer o tegumento interferindo nas mudanças ocorridas em todo o sincício, afetando assim, toda a fisiologia de *S. mansoni*.

É interessante notar que a exposição de cercárias ao látex reduziu o número de parasitos adultos e de ovos liberados, influenciando a transmissão da esquistossomose. A análise proteômica de machos adultos de *S. mansoni* oriundos de cercárias expostas ao látex (grupo 2) nos mostram a expressão diferencial em proteínas alvo, associadas a cinco componentes celulares: fibra contrátil, citoesqueleto de actina, membrana intracelular, citoplasma e complexo proteico; e oito funções moleculares: metabolismo energético (ATP), atividade estrutural, contração do musculo esquelético, ligação à calmodulina, processos metabólicos, atividade da oxireductase e atividade de NAD/NADH, sugerindo assim a influência do látex no desenvolvimento e sobrevivência dos parasitos.

Para confirmar estas evidências, 26 *spots* de proteínas diferencialmente expressas em ambos os grupos experimentais foram detectadas na eletroforese bidimensional. É interessante notar que cinco *spots* não foram identificados em espécimes do grupo 2 (Actina-R5, Troponina-R8, Tropomiosina-R10 Paramiosina-R11 e Paramiosina-R15). O gene da Actina tem forte associação com membranas de superfície e é muito importante para a atividade dinâmica dos parasitos e outros organismos (Braschi et al., 2006). De maneira geral, é abundantemente encontrada em células eucarióticas e está envolvida em muitos processos biológicos, tais como formação de ATP, ligação de nucleotídeos, regulação do citoesqueleto de actina, remodelação de tecidos e apoptose (Gourlay e Ayscough, 2005; Watanabe et al., 2015). O proteoma da superfície de *S. mansoni* apresenta uma intensa atividade motora e molecular e a camada imediatamente abaixo da membrana plasmática é composta por um complexo macromolecular de homólogos de actina envolvido no transporte transmembrana de vesículas (Braschi et al., 2006).

Em espécies do gênero *Schistosoma* são observadas isoformas de actinas envolvidas em diferentes modos de motilidade do parasito (Abbas 1987, Abbas & Cain 1989) e, no presente estudo, os *spots* R4 e R7 validados como actina foram regulados negativamente, sendo R7 (-4,04), o *spot* mais reprimido observado ao longo de todo o trabalho. Como perspectiva, seria interessante identificar em futuros trabalhos, o tipo molecular de actinas diferencialmente expressas em parasitos provenientes do grupo 2. Tais resultados indicam claramente que a actina é um alvo importante para a atividade fitoquímica de *E. milii*, sendo esta proteína já identificada em forma de “cristais de actina” nos espinhos dispersos no tegumento de parasitos adultos (Cohen et al., 1982). Actina também tem sido relatada como alvo para a ação do Praziquantel® (Tallima & El Ridi 2007). Em conjunto com outras proteínas, actina tem importante papel com antígenos circulantes em infecção de *S. mansoni* em humanos, além de capacidade de induzir resposta imunoprotetora em animais experimentais (Sulbarán et al., 2013, Ludolf et al., 2014). As informações acerca da importância da actina na manutenção de adultos de *S. mansoni* corroboram com os resultados referentes a redução do número de vermes adultos machos encontrados em animais infectados com cercárias expostas ao látex de *E. milii* quando comparados ao grupo controle. Assim, o látex de *E. milii* parece alterar a expressão de actina e, conseqüentemente, reduzir o número de espinhos na superfície do tegumento e alterar a interação com o complexo de contração muscular troponina/tropomiosina.

As proteínas Troponina T (gene: Smp_179810) e Paramiosina (gene: Smp_0198290) foram encontradas exclusivamente em perfis de parasitos do grupo

controle e estão associadas a função do citoesqueleto de Actina e em processos do sistema muscular, ambos importantes para a motilidade de machos de *S. mansoni*. Gobert et al. (2009) detectaram elevados níveis de expressão de Paramiosina em *Schistosoma japonicum*, sendo atribuídas a esta proteína as seguintes funções: estruturação das fibras de músculo liso, imunomodulação da resposta imune do hospedeiro através da sua ligação com a região Fc de imunoglobulina e inibição da ativação do sistema complemento (Loukas et al., 2001). No passado, muitos estudos foram estimulados para melhor compreender as multifunções da Paramiosina, sendo assim, estimulados projetos com potencial desenvolvimento como candidato a vacinal (Jones et al., 2004).

As proteínas 14-3-3 Epsilon e Aldeído Desidrogenase foram diferencialmente expressas entre os grupos 1 e 2. A menor expressão de 14-3-3 Epsilon em indivíduos formados por cercárias previamente expostas ao látex pode indicar uma possível redução no ciclo de vida de células de tais parasitos, pois esta proteína tem importante função na via de sinalização de PI3K-Akt e no ciclo celular (Protásio et al., 2012). Esta via de sinalização responde a sinais de sobrevivência em uma ampla gama de tipos de células neuronais e pode estar envolvida com vias metabólicas de regulação e sobrevivência das células (Brunet et al., 2001). A expressão reduzida de Aldeído Desidrogenase corrobora com as evidências da perturbação da homeostasia parasitária em decorrência do estresse causado pelo látex, pois tal proteína possui função no metabolismo de glicose, piruvato, arginina e degradação de ácidos graxos, entre outros.

Curiosamente, a exposição de cercárias de *S. mansoni* com o látex alterou a capacidade de expressão da proteína hsp70 em parasitos adultos do grupo 2, pois níveis de expressão significativamente superior foram observados. Esta proteína é um importante imunógeno em infecções de *S. mansoni*, sendo a expressão de níveis de mRNA hsp70 observada em miracídio, esporocisto e adultos. Segundo Neumann et al. (1993), embora a expressão da proteína de choque térmico hsp70 ocorra em algumas fases do ciclo de *S. mansoni*, os maiores níveis são observados na transição cercária-esquistossômulo, sendo sua indução relacionada a diferentes fatores como: o próprio estresse fisiológico, o contato com maiores temperaturas do parasito no corpo do hospedeiro definitivo e concentração de sais. Considerando a não expressão de hsp70 na fase cercária e o aumento dos níveis observados desta proteína em machos adultos de *S. mansoni*, fica claro que os efeitos tóxicos deste produto ainda são detectados na fase adulta.

A proteína Tropomiosina (Smp_044010.2) não foi detectada nos machos adultos após a exposição. A ausência ou baixa expressão desta proteína (e homólogos) pode ser

perigosa para a sobrevivência de *S. mansoni* interferindo na constante renovação do tegumento, na modulação da resposta imune do hospedeiro, na osmoregulação, e reprodução, dentre outros (Faghiri et al., 2010).

A construção de redes de interação com as proteínas, diferencialmente expressas identificadas no presente estudo, validadas manualmente e estatisticamente possui mais interações entre si do que o que seria esperado para um conjunto aleatório de proteínas de tamanho similar, tendo com referência o genoma de *S. mansoni* (p-valor = 0,000206). Tal interação indica que as proteínas observadas no presente estudo participam, mesmo que parcialmente, do mesmo processo biológico.

De acordo com a análise preditiva do software STRING, quatro redes de interação com 10 rotas metabólicas foram alteradas nos parasitos do grupo 2 quando comparados ao grupo 1. Dentre as rotas metabólicas alteradas, a única associada a uma proteína com aumento de expressão foi o processamento de proteínas no retículo endoplasmático, por apresentar associação estatisticamente significativa com hsp70. Em contra partida, as demais rotas metabólicas estão associadas a proteínas com redução de expressão, sendo assim, levando a uma redução nas atividades das seguintes rotas: metabolismo energético (glicólise/glicogenólise, metabolismo de glicerolípido, na interconversão de pentose e glucoronato e metabolismo do piruvato), no metabolismo da histidina, na degradação de ácidos graxos, no metabolismo do triptofano, metabolismo do propanoato e no metabolismo de arginina e prolina.

Os esquistossômulos de *S. mansoni* têm predominância pelo metabolismo anaeróbico, diferente do que ocorre com as cercárias, que apresentam metabolismo aeróbico. Nesta fase do ciclo parasitário, os vermes jovens e adultos são fermentadores homoláticos, ocorrendo a glicólise com a formação de duas moléculas de piruvato e este sendo convertido em ácido láctico pela ação da lactato-desidrogenase com pouca perda energética (Rumjanek et al., 2008). No presente estudo, o metabolismo energético de parasitos machos do grupo 2 foi alterado, possivelmente modulando a mobilização de glicose e podendo modificar em consequência, a formação de piruvato, atuando diretamente na produção rápida de energia, estratégia evolutiva bem sucedida dos parasitos. Além disso, a incorporação de outros nutrientes também é afetada como arginina e histidina, também identificadas nesta análise (Cornford & Fitzpatrick, 1992).

Apesar de parasitos adultos apresentarem tubo digestivo, a entrada de pequenas moléculas como monossacarídeos e aminoácidos ocorre também por via transtegumentar (Cornford et al., 1988). Segundo Rumjanek et al. (2008), o transporte de glicose através

do tegumento de *S. mansoni* ocorre por transportadores denominados SGTP1 e SGPT4 (*Schistosome glucose transponder 1 e 4*), sendo o primeiro localizado na membrana basal do tegumento e o segundo na camada externa. Cornford et al. (1988), sugeriram que a mobilização de glicose para as fêmeas deve ser realizada pelos parasitos machos, tendo em vista a distintas taxas de incorporação de glicose pelos sexos, bem como sua presença por um longo tempo no canal ginecóforo.

A incapacidade na geração de ácidos graxos de cadeia longa ou colesterol ‘*de novo*’ por adultos de *S. mansoni* (Meyer et al., 1970) leva o parasito a incorporar lipídeos do hospedeiro. Esta capacidade pode estar alterada em parasitos do grupo 2, devido a possíveis alterações na degradação de ácidos graxos como visto nos resultados de análise preditiva deste estudo. Esta alteração pode levar a perdas reprodutivas pela fêmea, também observado nesse trabalho. Ressalta-se que a perda da incorporação de lipídeos é alvo da única vacina em fase clínica para esquistossomose no mundo (Tendler et al., 2015).

Quanto à análise do gene 18S rRNA, os resultados sugerem um cenário de compensação metabólica frente ao estresse, com aumento da expressão gênica total em decorrência de um processamento proteico menos eficiente. Este gene foi proposto como referência para estudos toxicológicos em parasitologia, sendo confirmada sua sensibilidade frente à diferentes compostos em Nematoda (Wu et al., 2014, Lecová et al., 2015). E agora também observado no modelo *E.milii* e no Trematoda *S. mansoni*, utilizados neste estudo..

As mudanças drásticas no perfil proteômico de parasitos oriundos de cercárias expostas ao látex de *E. milii* pode ter induzido uma fragilidade muscular significativa no corpo de machos adultos de *S. mansoni*, com a consequente redução da carga parasitária como observado no presente estudo. Devido à sua natureza monogâmica, podemos inferir ainda que tal fragilidade muscular possa alterar a habilidade do macho em manter a fêmea durante o ato reprodutivo, bem como alterar a capacidade migratória necessária a oviposição, justificando assim, o baixo número de ovos observados.

A dinâmica de ciclo biológico de parasitos como *S. mansoni* tem como um dos pontos chave a fragilidade de formas larvares nos ambientes límnicos, nos quais estão sujeitas a diferentes compostos solúveis que podem afetar a continuidade deste ciclo. Até o presente momento são raros os estudos que avaliam a potencialidade de extratos vegetais interferirem na continuidade do ciclo evolutivo de *S. mansoni* tendo como alvo as cercárias no ambiente límnic. O presente estudo além de mostrar ser possível

interferir nesta fase do parasito, também foi capaz de indicar os efeitos na organização da morfologia do verme adulto, em sua biologia e na expressão de suas proteínas.

Possivelmente o látex atua interferindo na evolução do parasito, afetando inclusive a população de verme adulto no hospedeiro vertebrado. Este estudo abre fronteiras para uma visão eficiente do controle da esquistossomose em áreas endêmicas, usando produtos naturais solúveis em água em concentrações subletais para moluscos, que podem reduzir a carga parasitária no hospedeiro definitivo. Esta ação indireta é barata, ecológica e eficiente e pode, no futuro, auxiliar a terapia por anti-helmínticos atualmente preconizados pela OMS, ampliando a utilização do látex de *E. milii* de moluscicida para esquistossomostático.

7. CONCLUSÃO

- 1) A exposição de cercárias de *S. mansoni* ao látex de *E. milii* em condições experimentais altera a dinâmica parasitária de *S. mansoni*, onde observa-se significativa redução na formação de parasitos adultos e na atividade reprodutiva de parasitos adultos;
- 2) O tegumento de parasitos adultos oriundos de cercárias expostas ao látex de *E. milii* apresentam modificações em importantes estruturas como ventosas oral e ventral em ambos os sexos, perda do padrão de espinhos e tubérculos no dorso de parasitos machos e a ausência total de espinhos no canal ginecóforo;
- 3) As cercárias de *S. mansoni* expostas ao látex de *E. milii* apresentam alterações na morfologia e composição química do tegumento do macho adulto. É possível que estas mudanças possam afetar indiretamente a ontogenia do parasito;
- 4) O látex de *E. milii* tem efeito “esquistossomostático” sobre cercárias de *S. mansoni*.
- 5) Em machos adultos de *S. mansoni*, oriundos de cercárias expostas ao látex de *E. milii* houve alteração no perfil de expressão proteica com significativa redução na expressão de proteínas de tegumento e contração muscular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas MK, Cain GD 1987. Actin and intermediate-sized filaments of the spines and cytoskeleton of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 73: 66-74.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS 1997. Effector mechanisms of immune response. JN: Cellular and molecular Immunology, 3.ed. Boston, Massachusetts, USA: W.B. Saunders Company, 486p.

Aires AL, Ximenes ECPA, Silva, RAR, Barbosa VX, Góes AJS, Peixoto CA, Souza VMO, Albuquerque MCPA 2014. Ultrastructural analysis of β -Lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Exp Parasitol* 142, 83-90.

Andrews P, Thyssen J, Lorke D 1983. The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. *Pharmacol Ther* 19, 245-295.

Augusto RC, Friani G, de Vasconcellos MC, Rodrigues MLA, Mello-Silva CC 2015. *Schistosoma mansoni*: Phytochemical effect on aquatic life cycle. *Open J Vet Med* 5, 127-132.

Bakry FA, Mohamed RT 2011. Impact of *Euphorbia milii* latex on infectivity of *Schistosoma mansoni* larval stages to their hosts. *Evol Biol J Res* 3, 101-107.

Beltran S, Boissier J 2010. Male-biased sex ratio: why and what consequences for the genus *Schistosoma*? *Trends in Parasitol* 26, 63-69.

Bergquist NR, Leonardo LR, Mitchell GF 2005. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? *Trends Parasitol* 21, 112-117.

Bhatnagar VP, Anil K, Srivastava JN 2000. Wild medicinal herbs of Agra. *J Med Arom Plant Sci* 24, 464-467.

Bockarie MJ, Kelly-Hope LA, Rebollo M, Molyneux DH. 2013. Preventive chemotherapy as a strategy for elimination of neglected tropical parasitic diseases: endgame challenges. *Phil Trans R Soc B* 368, 20120144.

Bogitsh B, Carter C, Oeltmann T 2005. *Human Parasitology*. Burlington: Elsevier Academic Press.

Boissier J, Moné H 2001. Relationship between worm burden and male proportion in *Schistosoma mansoni* experimentally infected rodents and primates. A meta-analytical approach. *Int J Parasitol* 31, 1597-1599.

Bradford M 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Braschi S, Curwen RS, Ashton PD, Verjovski-Almeida S, Wilson A. 2006. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics* 6, 1471–1482.

Brasil, Ministério da Saúde. *Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS*. Disponível em <http://www.datasus.gov.br> [Acessado em 15 de fevereiro de 2016].

Brunet A, Datta SR, Greenberg ME 2001. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurol* 11: 297-305.

Buron, I, James, E, Riggs-Gelasco, P, Ringwood AH, Rolando E, Richardson D 2009. Overview of the status of heavy metal accumulation by helminths with a note on the use of in vitro culture of adult acanthocephalans to study the mechanisms of bioaccumulation. *Neotrop Helminthol* 3, 101-110.

Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL 2008. *Schistosoma mansoni: Uma visão multidisciplinar*. 1ªed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz. p. 966-1008.

Coelho, PMZ, Andrade, ZA, Borges, CMC, Ribeiro, F, Barbosa, L 2008. Evolução de *Schistosoma mansoni* no Hospedeiro Intermediário. In: *Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 149-160pp.

Cohen C, Reinhardt B, Castellani L, Norton P, Stirewalt M 1982. Schistosome surface spines are “crystals” of actin. *J Cell Biol* 95, 987–988.

Coles GC 1972. Oxidative phosphorylation in adult *Schistosoma mansoni*. *Nature* 240, 488-489.

Coles GC 2002. Drug resistance or tolerance in schistosomes? *Trends Parasitol* 18, 294.

- Combes C 1990. Where do human schistosomes come from? An evolutionary approach. *Trends Ecol Evol* 5, 324-337.
- Combes C, Poulin R 1999. The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitol.* 15, 474-5.
- Cornford E M, Fitzpatrick AM, Quirk TL, Diep CP, Landaw EM 1988. Tegumental glucose permeability in male and female *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 74, 116-128
- Cornford EM, Fitzpatrick AM 1992. Glucose-induced modulation of nutrient influx in *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 78, 266-70.
- Correa M 1984. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro 533 pp.
- Coura JR, Amaral RS 2004. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99, 13-19.
- Couto FF, Coelho PM, Araujo N, Kusel JR, Katz N, Jannotti-Passos LK, Mattos AC 2011. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to Praziquantel® using infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 106, 153-15
- Crignis RDN, Terra VR, Pani G, Santos JB, Silva AG, Cruz ZMA 2012. Determination of LD₅₀ of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (syn. *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri) against *Achatina fulica* (Bowdich, 1822). *Natureza online* 10, 77-80.
- Damian RT, Chapman RW 1983. The fecundity of *Schistosoma mansoni* in baboons, with evidence of sex ratio effect. *J Parasitol* 69, 987-9.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD 2000. Wildlife ecology emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443-449.
- Dawies TW, Erasmus DA 1984. An ultrastructural study of the effect of parasitism by larval *Schistosoma mansoni* on the calcium reserves of host, *Biomphalaria globata*. *Cell Tiss Res* 236, 643-649.
- De-Carvalho RR, Maldonado Jr A, Oliveira-Filho EC, Ribeiro AC, Paumgartten FJR, Rey L 1998. Effects of *Euphorbia milii* Latex on *Schistosoma mansoni*: Eggs, Miracidia and CercariaCercárias Cercariaeae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93, Suppl. I: 235-237.

Desprès S L, Imbert-Establet D, MONNEROT M 1993. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. *Mol Biochem Parasitol* 60, 221–23.

Devi LS, Gupta P 2000. Evaluation of some plant latices against *Heterodera cajani* on cowpea *Vigna sinensis*. *Natl Acad Sci India* 23, 65-67.

El Moussaoui AN, Paul C, Wintjens R, Vincentelli J, Azarkan M, Looze Y 2001. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell Mol Life Sci* 58, 556–570.

El-Ansary A, Mohamed SM, Mohamed AM 2001. Induced changes in energy metabolism of *Biomphalaria alexandrina* snails using two potent plant molluscicides. *Bull NRC Egypt* 26, 425-439.

Emily M, Mailund T, Hein J, Schauer L, Schierup MH 2009. Using biological networks to search for interacting loci in genome-wide association studies. *Euro J Hum Genet* 17, 1231–1240.

Erasmus DA 1986. Structural and metabolic changes in female *Schistosoma mansoni* following male stimulation. *J Chem Ecol* 12, 1755-1764.

Evans TE, Miller GC 1987. Scanning electron microscopy of *Schistosoma mansoni* adults from unisexual infection and bisexual infection. *J Elisha Mitchell Sci Soc* 103, 63-70.

Faghiri Z, Camargo SMR, Huggel K, Forster IC, Ndegwa D, Verrey F, Skelly PJ 2010. The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* of an excretory organ: The surface aquaporin SmAQP is a lactate transport. *Plos One* 5, e10451.

Faro MJ, Perazzini M, Corrêa LR, Mello-Silva CC, Pinheiro J, Mota EM, Souza S, Andrade Z, Maldonado-Júnior A 2015. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 134, 228-234.

Feil R, Fraga MF 2012. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 13, 97–109.

Fonseca KC, Morais NCG, Queiroz MR, Silva MC, Gomes MS, Costa JO, Mamede CCN, Torres FS, Penha-Silva N, Beletti ME, Canabrava HAN, Oliveira F 2010. Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopilii* latex. *Phytochemistry* 71, 708- 715.

Galaktionov A, Dobrovolskij AA. 2003. *The Biology and evolution of Trematodes. An essay on the biology, morphology, life-cycles, transmissions and evolution of digenetic trematodes*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 592 pages.

Genc E, Sangun MK, Dural M, Can MF, Altunhan C 2008. Element concentrations in the swimbladder parasite *Anguillicola crassus* (Nematoda) and its host the European eel, *Anguilla anguilla* from Asi River (Hatay-Turkey). *Environ Monit Assess* 141, 59- 65.

Genc E, Sangun MK, Dural M, Can MF, Altunhan C 2008. Element concentrations in the swimbladder parasite *Anguillicola crassus* (Nematoda) and its host the European eel, *Anguilla anguilla* from Asi River (Hatay-Turkey). *Environ Monit Assess* 141, 59- 65.

Giovanelli A, Silva CLPAC, Medeiros L, Vasconcellos MC 2001. The molluscicidal activity of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), a snail associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96, 123-125.

Gobert GN, Moertel L, Brindley PJ, McManus DP 2009. Developmental gene expression profiles of the human pathogen *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics* 10: 128.

Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Lyman CE, Lifshin E, Sawyer L, Michael JR. 2003. *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*. Springer, Berlin

Gonzalez-Mejia ME, Torres-Rasgado E, Porchia LM, Salgado HR, Totolhua JL, Ortega A, Hernández-Kelly LC, Ruiz-Vivanco G, Báez-Duarte BG, Pérez-Fuentes R 2014. Metallothionein-1 and nitric oxide expression are inversely correlated in a murine model of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109, 174-181.

Gourlay CW, Ayscough KR 2005. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 583-589.

Greenberg RM 2005. Are Ca²⁺ channels targets of Praziquantel® action? *Int J Parasitol* 35, 1–9.

Greenberg RM 2013. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. *Parasitol* 140:1534–1546.

Gryseels B, Mbaye A, De Vlas S J, Stelma FF, Guisse F, Van Lieshout L, Faye D, Diop M, Ly A, Tchuem-Tchuente LA, Engles D, Polman K 2001. Are poor responses to Praziquantel® for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Trop Med Int Health* 6, 864-873.

- Hamed MA. 2010. Strategic control of schistosome intermediate host. *Asian J Epidemiol* 3, 123-140.
- Hardy IC 2002. *Sex Ratios. Concepts and Research Methods*, Cambridge University Press
- Haseeb MA, Eveland LK 1991. *Schistosoma mansoni*: a chemoattractive factor released by males and its receptor in females. *Experientia* 47, 970-4.
- Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ 2008. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* 118, 1311-1321.
- Ismail M, Metwally A, Farghaly A, Bruce J, Tao LF, Bennett JL 1996. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of Praziquantel®. *Am J Trop Med Hyg* 55, 214-218.
- Jain SK 1996. *Medicinal Plants*, Sixth ed. National Book Trust, New Delhi, India.
- Jirsa F, Leodolter-Dvorak M, Krachler R, Frank C 2008. Heavy metal in the nase, *Chondrostoma nasus* (L. 1758), and its intestinal parasite *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas 1781) from Austrian rivers: Bioindicative aspects. *Arch Environ Contamin Toxicol* 55, 619-626.
- Johnston MJ, MacDonald JA, McKay DM 2009. Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules. *Parasitol* 136, 125-147.
- Jolly RE, Chin CS, Miller S, Baghat MM, Lim KC, DeRisi J, McKerrow JH 2007. Gene expression patterns during adaptation of the helminth parasite to different environmental niches. *Genome Biol* 8, R65.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993.
- Jones MK, Gobert GN, Zhang L, Sunderland P, McManus DP 2004. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *BioEssays* 26, 752-765.
- Jurberg P, Vasconcellos MC, Mendes NM 1989. Plantas empregadas como moluscicidas: Uma visão crítica. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84, 76-83.
- Katz N 2003. Esquistossomose, Xistosa, Barriga d'água. *Cienc Cult* 55, 652-656.
- Katz N, Peixoto SV 2000. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansônica no Brasil. *Rev da Soc Bras de Med Tropical* 33, 303-308.

- Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 7: 5383-5392.
- King CH 2010. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. *Acta Trop* 113, 95-104.
- Kvarnemo C, Ahnesjö I 1996. The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. *Trends Ecol Evol* 11, 404-408.
- Lafferty KD, Kuris AM 1999. How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnology and Oceanography* 44, 925-931.
- Lazzaro BP, Little TJ 2009. Immunity in a variable world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol Scienc* 364, 15-26.
- Lecová L, Ruzicková M, Laing R, Vogel H, Szotáková B, Prchal L, Lamka J, Vokrál I, Skálová L, Matoušková P 2015. Reliable reference gene selection for quantitative real time PCR in *Haemonchus contortus*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 201, 123-127.
- Lenzi HL, Jurberg AD, Coelho PMZ, Lenzi JA 2008. Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no Hospedeiro Definitivo. In: *Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 85-146pp.
- Lenzi HL, Pacheco RG, Pelajo-Machado M, Panasco MS, Romanha WS, Lenzi JA 1997. Immunological system and *Schistosoma mansoni*: co-evolutionary immunobiology. What is the eosinophil role in parasite-host relationship? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92, 19-32.
- Lepesant JMJ, Boissier J, Climent D, Cosseau C, Grunau C 2013. Female biased sex-ratio in *Schistosoma mansoni* after exposure to an allopatric intermediate host strain of *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol* 135, 350-356.
- Liang TS, Wang W, Dai JR, Li HJ, Tao YH, Zhang JF, Li W, Zhu YC, Coles GC, Doenhoff MJ 2010. Susceptibility to Praziquantel® of male and female cercariae of Praziquantel®-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. *J Helminthol* 84, 202-207.
- Liang YS, Coles GC, Dai JR, Zhu YC, Doenhoff MJ. 2001. Biological characteristics of Praziquantel®-resistant and -susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. *Ann Trop Med Parasitol* 95, 715-23.

- Lima MG, Augusto RC, Vasconcellos MC, Mello-Silva CC, Pinheiro J 2012. Metabolic changes in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* exposed to latex of *Euphorbia milii* solution versus times of preparation. *J Nat Products* 5, 222- 232.
- Lirio L, Hermano M, Fontanilla M 1998. Note Antibacterial Activity of Medicinal Plants from the Philippines. *Pharm Biol* 36, 357-359.
- Lorsuwannarat N, Saowakon N, Ramasoota P, Wanichanon C, Sobhon P. 2013. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 133, 18–27.
- Loukas A, Jones MK, King LT, Brindley PJ, McManus DP 2001. Receptor for Fc on the surfaces of Schistosomes. *Infect Immun* 69, 3646-3651.
- Ludolf F, Patrocínio PR, Corrêa-Oliveira R, Gazzinelli A, Falcone FH, Teixeira-Ferreira A 2014. Serological screening of the *Schistosoma mansoni* adult worm proteome. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2745. 10.1371/journal.pntd.000274.
- Lutz A, Penna O 1918. Estudos sobre a schistosomose feitos no norte do Brasil por uma comissão do Instituto Oswaldo Cruz. Relatório e notas de viagem apresentadas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 10, 83-94.
- Ma B, Zhang K, Hendrie C, Liang C, Li M, Doherty-Kirby A, Lajoie G 2003. PEAKS: Powerful software for peptide De Novo sequencing by MS/MS. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17: 2337-2342.
- Machado-Silva JR, Lanfredi RM, Gomes DC 1997. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92, 647-653.
- Madureira-Pará 1949. The distribution of certain diseases in Brazil as indicate by data obtained through viscerotomy. I The incidence of *Schistosoma mansoni* lesions in material collected from 1937 to 1946. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 47, 521-534.
- Manneck T, Haggemuller Y, Keiser J 2010. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on Schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol* 137, 85– 98.
- Marston A, Hecker E 1983. On the active principles of the Euphorbiaceae. VI. *Planta Medic* 47, 141-147.
- Mattos A, Kusel J, Pimenta P, Coelho P 2006. Activity of Praziquantel® on in vitro transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 101, 283-287.

Mayr 1982. *The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance*. Belknap Press, ISBN 0674364465

Mello RS, Ferreira ARS, Queiroz MMC 2010. Bioactivity of latex from *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (Euphorbiaceae) on post-embryonic development of *Megaselia scalaris* (Phoridae). *Vet Parasitol* 172, 100-104.

Mello-Silva CC, Vasconcellos MC, Bezerra JCB, Rodrigues MLA, Pinheiro J 2011. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop* 117, 101–104.

Mello-Silva CC, Vasconcellos MC, Pinheiro J, Rodrigues MLA 2006. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101, 3-8.

Mello-Silva CC, Vilar MM, Bezerra JCB, Vasconcellos MC, Pinheiro J, Rodrigues, MLA 2007. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 671-674.

Mello-Silva CC, Vilar MM, Vasconcellos MC, Pinheiro J, Rodrigues MLA. 2010. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105, 492-495.

Mendes NM, Vasconcellos MC, Baptista DF, Rocha RS, Schall VT 1997. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) latex: experimental test in an endemic area in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92, 719-724.

Meyer F, Meyer H, Bueding E 1970. Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. *Biochim Biophys Acta* 210, 257–266.

Morais AM, Malta JCO 2014. Chemical analysis through “energy-dispersive spectroscopy (EDS)” of digenea metacercariae found infesting specimens of *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes: Callichthyidae), captured in Manaus polluted Igarapes. *Neotrop Helminthol* 8, 217-225.

- Morley NJ, Crane M, Lewis JW 2002. Toxicity of Cadmium and Zinc Mixtures to *Diplostomum spathaceum* (Trematoda: Diplostomidae) Cercarial Survival. Arch Environ Contam Toxicol 43, 28–33.
- Mostafa OMS, Eid RA, Adly MA 2011. Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. Parasitol Res 109, 395-403.
- Mwine JT, Damme PV 2011. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. J Med Plants Res 5, 652-662.
- Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Abersold R 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Anal Chem 75, 4646-4658.
- Neumann S, Ziv E, Lantner F, Schechter I 1993. Regulation of gene expression HSP70 During the life cycle of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. J Biochem 212, 589-596.
- Olds GR, King C, Hewlett J, Olveda R, Wu G 1999. Double-blind placebo-controlled study of concurrent administration of albendazole and Praziquantel® in schoolchildren with schistosomiasis and geohelminths. J Infect Dis 179, 996–1003.
- Oliveira CS 2007. Alterações nos depósitos de glicogênio e conteúdo de glicose na hemolinfa de *Achatina fulica* bowdich, 1822 (mollusca, gastropoda), hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus*, exposta ao látex de coroa de cristo *Euphorbia splendens* var. *hislopii*. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Oliveira MF, D'ávila JC, Torres CR, Oliveira PL, Tempone AJ, Rumjanek FD, Braga JR, Silva JR, Dansa-Petretski M, Oliveira MA, Souza W, Ferreira ST 2000. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. Molecul Bioch Parasitol 111, 217-21.
- Oliveira SA, Barbosa AA Jr, Gomes DC, Machado-Silva JR, Barros AF, Neves RH, Coutinho EM 2003. Morphometric study of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from Undernourished infected mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 98, 623-7.
- Oliveira-Filho EC, Paumgartten FJR 1997. Photodegradation of the molluscicidal latex of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milli* var. *hislopii*). Mem Inst Oswaldo Cruz 92, 657-659.

Paaijmans KP, Blanford S, Bell AS, Blanford JI, Read AF, Thomas MB 2010. Influence of climate on malaria transmission depends on daily temperature variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 15135–15139.

Palatnik W, Tenenbein M 2000. Hepatotoxicity from Castor bean ingestion. *J Toxicol Clin Toxicol* 38, 67-9.

Parker M, Allen T 2011. Does mass drug administration for the integrated treatment of neglected tropical diseases really work? Assessing evidence for the control of schistosomiasis and soil-transmitted helminths in Uganda. *Health Res Policy Syst* 9, 3.

Pellón AB, Teixeira I 1950. *Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil*. Rio de Janeiro: Divisão da Organização Sanitária.

Pirajá da Silva MA 1908/1909. “La Schistosomose à Bahia”. *Archives de Parasitology* 13, 283-302.

Popiel I 1986. Male-stimulated female maturation in *Schistosoma*: a review. *J Chem Ecol* 12, 1745–54.

Protasio AV, Tsai IJ, Babbage A, Nichol S, Hunt M, Aslett MA 2012. The systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1455.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2012.

Rey L 2008. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4º Ed.

Ribeiro-Paes JT, Rodrigues V 1997. Sex Determination and Female Reproductive Development in the Genus *Schistosoma*: A Review. *Rev I Med Trop* 39, 337-44.

Rice EL 1974. *Allopathy*. Academy Press, London. pp. 353.

Rocha Pitta MG, Rocha Pitta MG, de Melo Rego M, Galdino LS 2013. The evolution of drugs on schistosoma treatment: looking to the past to improve the future. *Mini Rev Med Chem* 13, 493–508.

Roquis D, Lepesant JMJ, Picard MAI, Freitag M, Parrinello H, Groth M, Emans R, Cosseau C, Grunau C 2015. The epigenome of *Schistosoma mansoni* provides insight about how cercariae poise transcription until infection. *Plos Negl Trop Dis* 9:e0003853

- Rumjanek FD, Caldas IR, Gazzinelli 2008. Bioquímica de *Schistosoma mansoni*. In: *Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 85-146pp.
- Ryman JE, Van Walleghem JLA, Blanchfield PJ 2008. Methylmercury levels in a parasite (*Apophallus brevis* metacercariae) and its host, yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquat Ecol* 42, 495-501.
- Sambon LW. 1907. Remarks on *Schistosoma mansoni*. *J Trop Med Hyg* 10, 303-304.
- Schall VT, Vasconcellos MC, Rocha RS, Souza CP, Mendes NM 2001. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn *milli* Des Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. *Acta Trop* 79, 165-170.
- Schall VT, Vasconcellos MC, Souza CP, Baptista DF 1998. The molluscicidal activity of crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. *Am J Trop Med Hyg* 58, 7-10.
- Schall VT, Vasconcellos MC, Villaça-Rabbit AL, Ferreira-Lopes FE, Smith IP 1992. Evaluation of temporal, seasonal and geographic stability of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens* latex. *Rev Inst Med Trop* 34,183-191.
- Scholte RG, Gosoni L, Malone JB, Chammartin F, Utzinger J, Vounatsu P 2014. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Trop* 132, 57-63.
- Schussler P, Grevelding CG, Kunz W 1997. Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction. *Parasitol* 115, 629-34.
- Seigler DS 1994. Phytochemistry and systematic of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Bot Gard* 81, 380-401.
- Senft AW, Gibler WB, Knopf PM 1978. Scanning electron microscope observations on tegument maturation in *Schistosoma mansoni* grown in permissive and non-permissive hosts. *Am J Trop Med Hyg* 27, 258-266.

- Shaw MK, Erasmus DA 1984. *Schistosoma mansoni*: Electron probe X-ray microanalysis of the elemental composition of the tegument and subtegumental tissues of adult worms. *Exp Parasitol* 58, 163–181
- Shi QW, Su XH, Kiyota H 2008. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. *Chem Rev* 108, 4295- 4327.
- Shuhua X, Binggui S, Utzinger J, Chollet J, Tanner M 2002. Ultrastructural Alterations in Adult *Schistosoma mansoni* Caused by Artemether. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 717-724.
- Shuhua X, Hotez PJ, Tanner M 2000. Artemether, an effective new agent for chemoprophylaxis against schistosomiasis in China: it's in vivo effect on the biochemical metabolism of the Asian schistosome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 31, 724–732.
- Sigel A, Sigel H, Singel RKO 2009. *Metallothioneins and Related Chelators (Metal Ions in Life Sciences)*. *Metal Ions in Life Sciences v.5*. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry.
- Silva JRMC, Neves RH, Gomes DC 2008. Filogênia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão interdisciplinar*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. p. 823-847. 2008.
- Singer C, Zimmermann S, Sures B 2005. Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): Comparison with lead and cadmium exposures. *Aquat Toxicol* 75, 65–75.
- Singh DK, Agarwal RA 1984. Correlation of the anticholinesterase and molluscicidal activity of the latex of the *Euphorbia royleana* Bioss on *Lymnaea acuminata*. *J Natural Products* 47, 702-705.
- Singh SK, Yadav RP, Singh A 2010. Molluscicides from some common medicinal plants of eastern Uttar Pradesh. *India J Appl Toxicol* 30, 1-7.
- Singla A, Pathak K 1990. Topical antiinflammatory effects of *Euphorbia prostrata* on carrageenan-induced footpad oedema in mice. *J. Ethnopharmacol* 29, 291 – 294.

- Smyth JD, Halton DW 1983. *The Physiology of Trematodes*. Second edition. Cambridge University Press, Cambridge, 445 pp.
- Sorci G, Cornet S, Faivre B 2013. Immunity and the emergence of virulent pathogens. *Infect, Gen, Evol* 16, 441–446.
- Souza CA, De Carvalho RR, Kuriyama SN, Araújo IB, Rodrigues RP, Vollmer RS, Alves EM, Paumgartten FJR 1997. Study of the embriofeto-toxicity of “crow of thorns” (*Euphorbia milli* var *hislopii*) latex, a natural molluscicide. *Braz J Med Biol Res* 30, 1325-1332.
- Stirewalt MA, Dorsey CH 1974. *Schistosoma manonsi*: cercarial penetration of host epidermis at the ultrastructural level. *Exp Parasitol* 35, 1-15.
- Sturrock RF, Cottrell BJ, Kimani R 1984. Observations on the ability of repeated light exposures to *Schistosoma mansoni* cercariae to induce resistance to re-infection in Kenyan baboons (*Papio anubis*). *Parasitol* 88, 505–11.
- Subhash C, Yadav MP, Jagannadham MV 2006. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochemistry* 67, 1414–1426.
- Sulbarán G, Noya O, Brito B, Ballén DE, Cesari IM 2013. Immunoprotection of mice against schistosomiasis mansoni using solubilized membrane antigens. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2254.
- Sures B, Zimmermann S, Sonntag C, Stuben D, Taraschewski H 2003. The acanthocephalan *Paratenuisentis ambiguus* as a sensitive indicator of the precious metals Pt and Rh from automobile catalytic converters. *Environ Pollution* 122, 401-405.
- Takougang I, Meli J, Angwafo F 2006. Field trials of low dose Bayluscide on snail hosts of schistosome and selected non-target organisms in sahelian Cameroon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101, 355-358.
- Tallima H, El Ridi R 2007. Re: is actin the Praziquantel® receptor? *Int J Antimicrob Agents* 30:566–7.
- Tchounwou PB, Englande Jr AJ, Malek EA 1992. The influence of selected environmental parameters on the toxicity of Bayluscide to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Arch Environ Toxicol* 23, 223-229.
- Teles HMS, Carvalho OS 2008. Implicações da biologia de Biomphalaria no controle da esquistossomose. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. *Schistosoma*

mansoni: *Uma visão multidisciplinar*. 1^oed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz. p. 966-1008. 2008.

Tendler M, Almeida M, Simpson A 2015. Development of the brazilian anti schistosomiasis vaccine based on the recombinant fatty acid binding protein Sm14 plus GLA-SE adjuvant. *Front Immunol* 6, 218.

Théron A 1986 Polymorphisme des oeufs de *Schistosoma mansoni* dans le foyer Guadaloupeén (Antilles Françaises): présence de ‘*S. rodhaini*-like’ parasites? *Acta Trop* 43, 335-342.

Thornhill J, Rabbit PM, McVeigh P, Maule A, Jurberg AD, Kusel JR 2009. *Schistosoma mansoni* cercariae experience influx of macromolecules during skin penetration. *Parasitol* 136, 1257-67.

Vasconcellos MC, Amorim A 2003. Molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (“*Christ’s Crown*”) (Euphorbiaceae) against *Lymanea columella* (Say; 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae); intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus; 1758 (Trematode: Fasciolidae). 1: Test in laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 557–563.

Vasconcellos MC, Schall VT 1986. Latex of “*Coroa de Cristo*” (*Euphorbia splendens*): an effective molluscicide. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81, 475-476.

Vega SG, Guzman P, Garcia L, Espinosa J, Cortinas NC 1988. Sperm shape abnormality and urine mutagenicity in mice treated with niclosamide. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 204, 2269-276.

Vlietink KJ, 1987. In: Hostettmann K, Lea PJ. *Biologically active substances from traditional drug Biologically active natural product*. Oxford Science Publications, Oxford.

Wataneble T, Wang S, Kaibuchi K 2015. IQGAPs the key regulators of actin cytoskeleton-dynamics. *Cell Struct Funct* 40, 69-77.

WHO 2002. *Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis*, WHO, Geneve, 57pp.

WHO 2014. *Report of the who strategic and technical advisory group for neglected tropical diseases*. Salle B, WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 2014.

Wolinska J, King KC 2009. Environment can alter selection in host–parasite interactions. *Trends in Parasitol* 25, 236–244.

- Wu H, Taki FA, Zhang Y, Dobbins DL, Pan X 2014. Evaluation and identification of reliable reference genes for toxicological study in *Caenorhabditis elegans* Mol Biol Rep 41, 3445–3455.
- Xavier A, Tavares D, Guimarães E, Sarro-Silva M, Silva A, Neto A 2014. Ultrastructural alterations in adult *Schistosoma mansoni*, harbored in non-antihelminthic treated and low-inflammatory mice by transmission electron microscopy (TEM). Acta Trop 130, 51-57.
- Xavier AM, Magalhães JA, Cunha GS, Silva AC, Tavares DA, Sarro-Silva MF, de Moraes Neto AH 2010. Morphological tegument alterations of adult *Schistosoma mansoni*, harbored in non anti-helminthic treated, high-immunotolerogenic and low-inflammatory mice. Acta Trop 116, 95–99.
- Xiao S, Shen B, Utzinger J, Chollet J, Tanner M. 2002. Ultrastructural alterations in adult *Schistosoma mansoni* caused by artemether. Mem Inst Oswaldo Cruz 97, 717-724.
- Xiao SH, Chollet J, Weiss NA, Bergquist RN, Tanner M 2000. Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. Parasitol Int 49, 19-24.
- Yadav SC, Jagannadham MV 2008. Physiological changes and molluscicidal effects of crude latex and Milin on *Biomphalaria glabrata*. Chemosphere 71, 1295–1300.
- Zahra NB, Ahmad M, Shinwari ZK, Zafar M, Sultana S 2014. Systematic significance of anatomical characterization in some Euphorbiaceous species. Pak J Bot 46, 1653-1661.
- Zamith HPS, Paumgarten FJR, Speit G 1996. *Evaluation of the mutagenicity of the molluscicidal latex of information on the chemical used as active components of pesticides*. British Crop Protection Council, 383p.
- Zani CL, Marston A, Hamburger M, Hostettmann K 1993. Molluscicidal milliamines from *Euphorbia milii* var. *hislopii*. Phytochemistry 34, 89-95.
- Zimmermann S, von Bohlen A, Sures, B 2005. Accumulation of the precious metals platinum, palladium and rhodium from automobile catalytic converters in *Paratenuisentis ambiguus* as compared with its fish host, *Anguilla Anguilla*. J Helminthol 79, 85-89.



ORIGINAL ARTICLE /ARTÍCULO ORIGINAL

FIRST ELECTRON PROBE X-RAY MICROANALYSIS OF THE ELEMENTAL COMPOSITION OF THE LYOPHILIZED LATEX OF *EUPHORBIA MILII* VAR. *HISLOPII* AND ITS IMPACT IN THE MALE *SCHISTOSOMA MANSONI*

LA PRIMERA SONDA DE ELECTRONES DE MICROANÁLISIS DE RAYOS X DE LA COMPOSICIÓN ELEMENTAL DEL PRODUCTO LIOFILIZADO DE LATEX DE *EUPHORBIA MILII* VAR. *HISLOPII* Y SU IMPACTO EN EL MACHO DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

Ronaldo de Carvalho Augusto^{1,2}; Clélia Christina Mello-Silva¹; Mario Jorge Gatti¹; Claudio L. Mafra³ & Claudia Portes Santos^{1*}

¹Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, 21040-361, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

³Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, MG, Brasil. *

Corresponding author to Ronaldo de Carvalho Augusto (Augusto, RC) Tel.: +55 21 25621526

E-mail address: augustorc@ioc.fiocruz.br (Ronaldo de Carvalho Augusto).

Neotropical Helminthology, 2016, 10(1), ene-jun: 13-22.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the elemental composition of the lyophilized latex obtained from *Euphorbia milii* var. *hislopii* (N.E.Br.) Ursch & Leandri) and the tegument of adult male of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 originated from cercariae previously exposed to the latex. The composition and concentrations of 15 elements were characterized using scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS). The Magnesium, Potassium and Rhodium were found in high *weight percent* in the lyophilized latex. High levels of Sodium, Nitrogen and Magnesium elements were detected respectively in control adult male *S. mansoni*. The cercariae exposition of *S. mansoni* to the *E. milii* latex changed the elemental composition of adult parasite, which showed higher level of Nitrogen instead of Sodium as observed in normal parasites. Furthermore the comparison of elements of the control group and the adult worms from cercariae exposed to the latex showed a significant decrease in Nitrogen and increase in Sodium, Potassium and Magnesium. The present work represents the first analysis of the elemental composition of the lyophilized latex of *E. milii* var. *hislopii* and its impact in the male *S. mansoni* by Electron Probe X-Ray Microanalysis.

Keywords: Cercariae - Chemical elements - *Euphorbia milii* - Schistosomiasis - Tegument - X-ray microanalysis

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la composición elemental del látex liofilizado obtenido de *Euphorbia milii* var. *hislopii* (N.E.Br.) Ursch & Leandri) y el tegumento del macho adulto de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 originado a partir cercarias previamente expuesta al látex. La composición y las concentraciones de 15 elementos se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y la espectroscopía de dispersión de energía (EDS). El magnesio, potasio y sodio se encontraron en un alto porcentaje en peso en el látex liofilizado. Altos niveles de los elementos sodio, magnesio y nitrógeno se detectaron, respectivamente, en el control de los machos adultos de *S. mansoni*. La exposición de cercarias de *S. mansoni* al látex de *E. milii* cambió la composición elemental del parásito adulto, que mostró un mayor nivel de nitrógeno en lugar de sodio como se observó en los parásitos normales. Además, se compararon los elementos del grupo de control y de los gusanos adultos de las cercarias expuestas al látex y mostraron una disminución significativa de nitrógeno y un aumento de sodio, potasio y magnesio. El presente trabajo representa el primer análisis de la composición elemental del látex liofilizado de *E. milii* var. *hislopii* y su impacto en el macho de *S. mansoni* por la Sonda de microanálisis de Electrones de Rayos X.

Palabras-clave: cercarias - Elementos químicos - *Euphorbia milii* - Esquistosomiasis - microanálisis de rayos X - Tegumento

INTRODUCTION

On Schistosomiasis control studies, despite the efficacy of chemotherapy in reducing morbidity, a decrease in the transmission of the parasite was not achieved (Bockarie *et al.*, 2013). Among these, many studies using bioactive plant compounds have been undertaken (Yadav & Jagannadham, 2008; Singh *et al.*, 2010; Hamed, 2010; Mello-Silva *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2012). In these, *Euphorbia milii* var. *hislopii* has been indicated as the most promising for use in official WHO programs for schistosomiasis control (WHO 2002). The biocidal activity of the latex has been tested for the control of snail's intermediate hosts of different parasites (Vasconcellos & Schall, 1986; Giovanelli *et al.*, 2001; Vasconcellos & Amorim, 2003; Mello-Silva *et al.*, 2010; Crignis *et al.*, 2012).

One of the main practices to evaluate the effect of control actions in *S. mansoni* is to evaluate the tegument of the parasite, because this structure is important to the survival,

performing vital functions such as the absorption of organic and inorganic compounds and the evasion of the host immune system (Braschi *et al.*, 2006). In addition, the male worm tegument is especially important because it is also responsible for the development and maturation of female worms (Ribeiro-Paes & Rodrigues, 1997). The tegumental surface of *S. mansoni* exposed to anthelmintic drugs, exhibits deformations such as scaling, erosion, spikes and bubbles (Xiao *et al.*, 2000; Lorsuwannarat *et al.*, 2013).

Despite the extensive accumulated knowledge of tegumental functions and biochemistry, little is known of the inorganic composition of this structure under the pressure of anthelmintic drugs. In recent years, the elemental microanalysis method, based on scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray spectrometry (SEM/EDS or TEM/EDS), has been applied to the detection and semi-quantification of chemical elements across a broad spectrum of physical and biological samples, including parasites (Goldstein *et al.*,

2003; Buron *et al.*, 2009; Morais & Malta, 2016).

The aim of this work was study the elemental composition of the lyophilized latex obtained from *Euphorbia milii* var. *hislopii* and the tegument of adult male of *S. mansoni* originated from cercariae previously exposed to the latex.

MATERIALS AND METHODS

Euphorbia milii var. *hislopii* samples

The *E. milii* var. *hislopii* latex was collected in the Ilhado Governador district (22°48'09''S/43°12'35''W), Rio de Janeiro, Brazil (Vasconcellos & Amorim, 2003). The latex sample collected was pre-frozen in dry ice and absolute ethanol and subsequently lyophilized at -52°C on 8 x 10⁻¹ mBar during three cycles of 12 h in a Modulo 4K Freeze Dryer with an acrylic chamber (Edwards High Vacuum Int., UK). The lyophilized pellet obtained was diluted in distilled water and homogenized by sonication for 20 min.

Schistosoma mansoni adult's samples

The *B. glabrata* (Belo Horizonte-lineage BH) used in the experiments had shell diameters between 8-10 mm and they were individually infected with 7±1 miracidia of *S. mansoni* (lineage BH) at the Laboratório de Esquistossomose Experimental (LEE), Instituto Oswaldo Cruz. After thirty days, the snails were individually exposed to light (60-watt incandescent bulb for 1 h) in becker (5ml) with distilled water to look for the release of cercariae. After this period, the snails were removed and the cercariae were separated into two groups.

The first cercarial group was kept in distilled water for one hour. The second group was exposed for the same period (one hour) to a sublethal concentration of the powdered

lyophilized latex of *E. milii* (LC₅₀=1.4 mg/L) as described by Schall *et al.* (1992) for *Biomphalaria glabrata* snails.

After this, fifteen female Swiss-Webster mice were infected with exposed cercariae and another fifteen with unexposed cercariae (control group). At 65 days post-infection, part of *S. mansoni* males, both the exposed and control groups, were collected and fixed in 70% ethanol.

The worms were dehydrated in an ethanol series (80%, 90% and three changes of 100%) prior to being critical point dried using CO₂. Powdered lyophilized latex, four specimens of the control group and four of the exposed group of *S. mansoni* were mounted in stubs, sputter-coated with carbon and observed in a Scanning Electron Microscope Leo 1430VP coupled to a probe X-ray (EDS) at the Núcleo de Microscopia e Microanálise of Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. We selected for SEM-EDS analysis the following elements: N (Nitrogen), Na (Sodium), Mg (Magnesium), Al (Aluminum), K (Potassium), Cr (Chromium), Fe (Iron), Cu (Copper), Rh (Rhodium), Pd (Palladium), Ag (Silver), Cd (Cadmium), Pt (Platinum), Hg (Mercury) and Pb (Lead). The qualitative and semi-quantitative composition of these elements were determined using the X-ray spectrum performed on a manually selected area and took into consideration 100% of the total amount of weight percent of elements measured (wt.%).

The results were expressed for each sample as the mean ± standard deviation and submitted to analysis of variance (ANOVA) and Student's t tests ($\alpha = 5\%$, $p \leq 0,05$) (GraphPad, V.4.00, Prism, GraphPad, vol. 3.02 Prism Inc.).

Ethics

This research was approved by the Animal Ethics Committee of the Oswaldo Cruz

Foundation (CEUA-FIOCRUZ LW-07/13), in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experiments (COBEA).

RESULTS

The ultrastructure of the lyophilized latex varied in the size and shape of the particles. Even after lyophilization, the latex formed pellets, clustered and arranged its particles of

different sizes and shapes in the form of a resin (Fig. 1A).

The energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS) of the lyophilized latex sample showed the *weight percent* (wt.%) of K (45.14), Rh (31.39), Mg (11.45), Hg (2.58), Pt (2.24), Al (2.14), Na (2.03), Pb (1.85) Cu (0.47), Cd (0.42), Cr (0.25) e Fe (0.13). The elements N, Pd and Ag were absent from the sample of lyophilized latex.

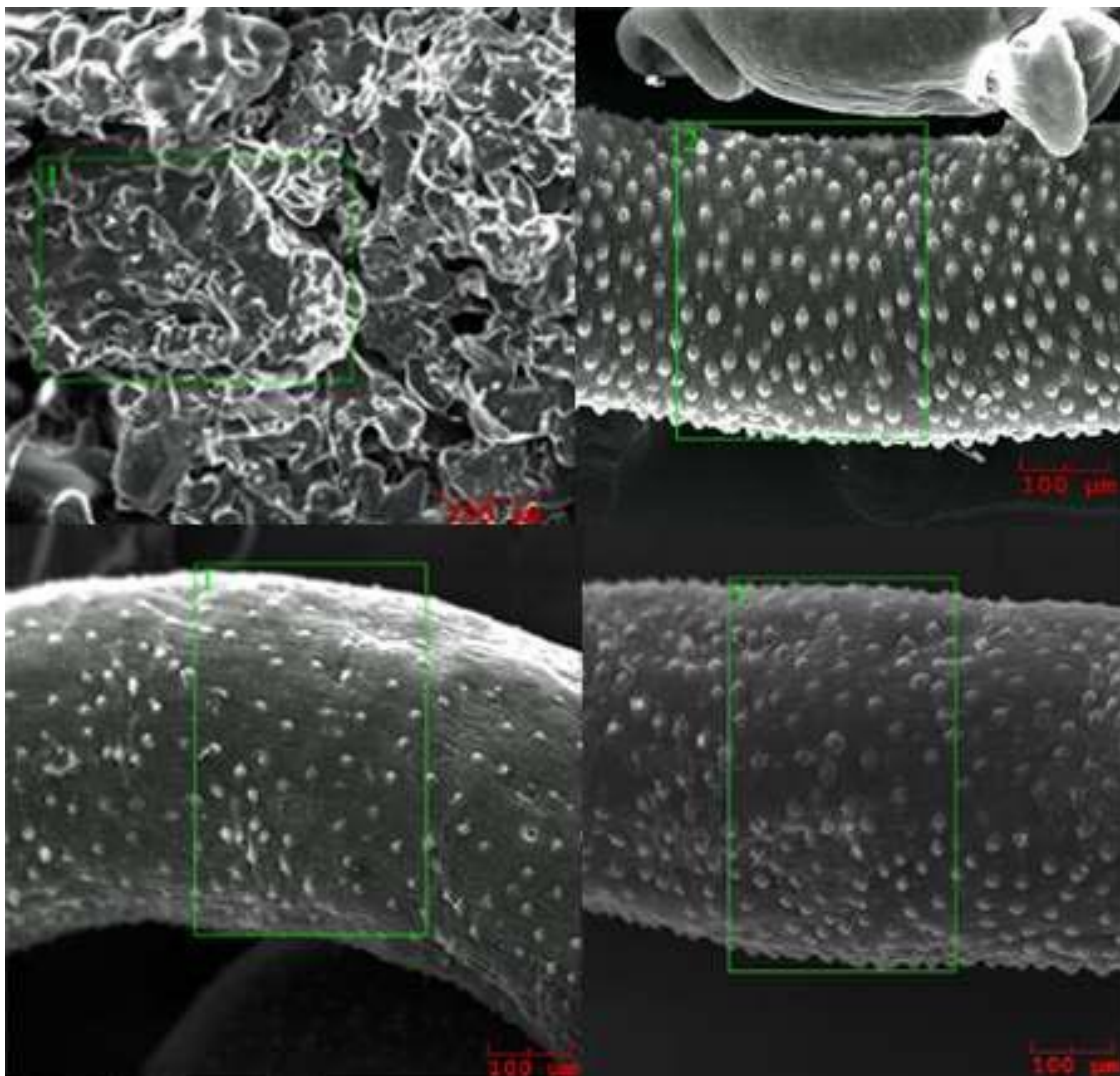


Figure 1. Structural feature of powdered lyophilized latex of *Euphorbia milii* var. *hislopii* and morphology of adult *Schistosoma mansoni* tegument came from cercariae previously exposed to this latex, by Scanning electron microscopy: (A) Powdered lyophilized latex. (B) Control tegument of adult male of *S. mansoni*. (C-D) Tegument of adult male of *S. mansoni* exposed to the latex at the cercarial stage showing intense damage to the external surface.

Table 1. Chemicals concentration on tegument of four adult males of *Schistosoma mansoni*. Control group (C) and group exposed (E) for one hour to 1.4 mg/L *Euphorbia milii* var. *hislopilii*. Data are expressed as mean \pm standard deviation ($\alpha = 5\%$, $p \leq 0.05$). N (Nitrogen). Na (Sodium). Mg (Magnesium). Al (Aluminum). K (Potassium). Cr (Chromium). Fe (Iron). Cu (Copper). Rh (Rhodium). Pd (Palladium). Ag (Silver). Cd (Cadmium). Pt (Platinum). Hg (Mercury) and Pb (Lead).

Elements Parasites	N		Na		Mg		Al		K		Cr		Fe		Cu	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
1	6.9	35.0	23.2	17.0	14.6	10.8	13.5	9.2	1.6	0.8	0.2	0.2	0.9	0.8	13.0	12.2
2	15.2	39.5	20.8	14.9	14.3	11.6	14.4	10.4	1.2	0.5	0.2	0.1	0.6	0.5	12.6	8.8
3	23.4	31.5	20.4	13.3	13.33	8.2	10.0	5.6	0.9	0.9	0.1	0.3	0.8	1.1	17.8	21.4
4	30.1	41.8	17.4	12.7	11.1	9.9	10.3	9.0	0.9	0.6	0.1	0.1	0.7	0.9	11.8	10.7
Mean	18.9 \pm 10.0	37.0 \pm 4.6	20.4 \pm 2.3	14.5 \pm 1.9	13.3 \pm 1.6	10.1 \pm 1.4	12.1 \pm 2.2	8.5 \pm 2.0	1.1 \pm 0.3	0.7 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.7 \pm 0.1	0.8 \pm 0.2	13.8 \pm 2.6	13.3 \pm 5.5
P-value	0.017		0.008		0.025		0.060		0.037		0.479		0.624		0.878	
Elements Parasites	Rh		Pd		Ag		Cd		Pt		Hg		Pb			
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E		
1	11.3	3.6	0.6	0.0	0.8	0.000	0.614	0.000	3.423	3.674	3.472	2.680	5.322	3.59		
2	9.78	6.3	0.7	0.0	1.1	0.213	0.000	0.000	3.077	1.876	2.845	2.634	2.806	2.09		
3	1.3	1.6	0.0	0.0	0.0	0.000	0.000	0.242	3.768	4.794	4.146	5.428	3.606	5.15		
4	7.4	5.2	0.0	0.0	0.3	0.108	0.000	0.000	3.137	2.581	3.553	2.783	2.664	3.07		
Mean	7.4 \pm 4.4	4.2 \pm 2.0	0.3 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.5 \pm 0.5	0.08 \pm 0.1	0.15 \pm 0.3	0.06 \pm 0.12	3.35 \pm 0.3	3.2 \pm 1.2	3.5 \pm 0.5	3.3 \pm 1.3	3.6 \pm 1.2	3.4 \pm 1.2		
P-value	0.227		-		0.091		0.593		0.861		0.872		0.898			

The SEM-EDS analyses of adult males of *S. mansoni* in control and exposed groups were conducted in the mid-dorsal section of the tegument (Figs 1B-1D). Each of the 15 elements analyzed in each worm and their weight as a percentage (wt.%) are presented in Table 1. As determined by EDS, all elements were present in both groups, but Pd was absent in the exposed group. The levels of *alkali metals* Na ($p < 0,008$), K ($p < 0,037$) and of alkali earth metal Mg ($p < 0,025$) were significantly higher in the tegument of the control group and the non-metal N was significantly higher in the exposed group. The percentages of Cr, Fe, Cu, Pt, H and Pb did not vary significantly between the control and the exposed groups.

The ultrastructure of the normal tegument in the mid-dorsal part of males of *S. mansoni* showed a pattern of a well organized distribution of tubercles and spines (Fig. 1B). The tegument of adult parasites originating from cercariae exposed to the latex of *E. milii* var. *hislopii* exhibited pronounced changes in the mid-dorsal surface. The most significant morphological changes observed were (i) a reduction in the number and size of the tubercles and spines, (ii) a disorganized distribution of the tubercles and (iii) damage to the tegument in the form of hollows and wrinkles (Figs 1C-1D).

DISCUSSION

The bioaccumulation of metals by helminths is a well acknowledged phenomenon; this is a process which, as pointed out in the overview by Buron *et al.* (2009), can be influenced by factors such as the nature of the metal itself, host age and motility, and the age, stage of development, sex and site of the parasite. The case, where cercariae of *S. mansoni*, which had been exposed to the latex of *E. milii* var. *hislopii*, produced effects in adult worms, showed that bioaccumulation can pass through

different life stages from the environment to the definitive host.

The *E. milii* var. *hislopii* is a widely distributed plant that occurs in almost all habitats and occupies a wide range of climes and soils (Zahra *et al.* 2014). The products of their secondary metabolites have been described as rich in diterpenes, triterpenes, flavonoids, saponins, tannins, alkaloids, esters, ricin and phenols (Mwine & Damme, 2011). These compounds have proved to be useful as anti-plasmodial, anti-malarial and molluscicidal products (Mwine & Damme, 2011). Previous tests with cercariae of *S. mansoni* exposed to this latex showed a slightly toxic effect, but without death of cercariae (De-Carvalho *et al.*, 1998). At present, this is the first description of the chemical elements of the lyophilized latex of *E. milii* var. *hislopii*.

Toxic metals were found in the latex, as Al (2.14%), Pt (2.24%), Hg (2.58%) and Rh (31.39 %). The occurrence of Rh is rare, being reported, in the environment as a discharge of anti-cancer medications or emitted by catalytic converters for automobile (Sures *et al.*, 2003; Singer *et al.*, 2005). In our study, the Rh even in high concentrations in the latex did not accumulate significantly in the exposed group (4.2%) when compared to the control group (7.4%). In the latex the weight percent of Al, Cu (0.47) and Pb (1.85) were low in relation to the control (12.1, 13.8 and 3.6 respectively) and exposed groups (8.5, 13.3 and 3.4). Morais & Malta (2016) also observed Cu, Pb and Al, among other elements, in different digenean metacercariae from fish caught in Manaus polluted streams (Brazil). Although they correlated the presence of these metals with toxic effluents originating from Manaus Industrial District factory sewers, it is interesting to note that Cu, Pb and Al were present in both our control and exposed groups, probably indicating that these elements may occur in different digenean species.

Other elements, such as Cd, Ag, and Pd were found in low concentrations in the tegument of the worms; the latter was only detected in the control group. Even though the biological functions of these elements are understudied, it is known that they are toxic in high concentrations, but essential for life in small quantities (Morley *et al.*, 2002). According to Sigel *et al.* (2009), there is a metallothionein-protein (MT) responsible for cell protection against reactive oxidants, including nitric oxide which has the capacity to bind to heavy metals such as Cu, Cd and Ag. González-Mejía *et al.* (2014) commented that the nitric oxide radical has a biological activity limiting the local inflammation caused by parasites. The reduction of Cd, Al, Rh and Ag in our exposed group in relation to MT protection against schistosomiasis is still to be evaluated.

Shaw & Erasmus (1984) evaluated the tegument of male of *S. mansoni* by electron probe X-Ray microanalysis using eight inorganic compounds. These authors observed high concentrations of K and low concentrations of Na, Fe and Mg, respectively. In our experiment, on the contrary, control group showed highest values of Na and Mg and small values of K and Fe. Shaw & Erasmus (1984) suggested that wt% values can change according to factors such as the strain of the parasite and host, fixation method and sample preparation and the metabolic/physiology status of the parasites.

The comparison of elemental composition of surface tegument between the control group of male of *S. mansoni* with the parasites formed from cercariae previously exposed to the latex, showed significant differences with higher levels of Na, Mg and K in the control group. In the exposed group, only N was significantly higher than in control group.

The tegument of *S. mansoni* seems to be primarily dependent on K^+ and Na^+ gradients that are responsible for a partial depolarization

of the surface membranes that leads to muscular contractions of the parasite (Smyth & Halton 1983). Comparing the elemental composition present in the latex with both male *S. mansoni* groups, we observed a large amount of K in the lyophilized latex (45.14), a low percentage in control group (1.1) and the exposed group had an even lower one (0.7). With regard to Na present in the latex (2.03) there was a significant difference ($p=0.008$) between the control (20.4) and the exposed groups (14.5). We observed that the exposure of cercariae to the latex did not change the muscle contraction of live adult parasites, in accordance with the proportion of ions of K^+ and Na^+ that remained regular. Therefore, the latex had no influence in the K^+ and Na^+ bomb.

Galaktionov & Dobrovolskij (2003) described that the contents in the excretory vesicle of trematodes also include Calcium (Ca), Mg and Phosphorous (P). The Mg was found in the control (13.3) and exposed groups (10.1) with a significant decrease in the latter. The alteration of Mg levels may be related to osmoregulation and also play an important role in muscle contraction together with Na and K (Galaktionov & Dobrovolskij 2003).

The tegument of *S. mansoni* constantly renews the outer layer of its syncytium, being adapted for ion transport, osmoregulation, absorption and the secretion of substances (Faghiri *et al.*, 2010). Besides, the parasite presents the mimetism capacity to scape to the host's immune system. The changes in wt% of the elemental composition of *S. mansoni* tegument may be involved in the morphological changes observed in tegument of the exposed group such as: reduction of tubercles and spines. Similar results were reported in the male tegument of *S. mansoni* exposed to praziquantel, artemether and the latex of allicin (Liang *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2012). These morphological changes may weaken the tegument, interfering with exchanges through the syncytium and thus

affecting the physiology of *S. mansoni*.

We conclude that when the cercariae of *S. mansoni* are exposed to *E. milii* latex, the subsequent adult male presents alterations in morphological and elemental composition of the tegument. It is possible that these changes may indirectly affect the ontogeny of the parasite.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to David I. Gibson from The Natural History Museum, London, UK, for his valuable suggestions, Francisco Paumgarten from Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP/Fiocruz) for the use of equipment and Patricia Pinto Machado from Laboratório de Esquistossomose Experimental (IOC/Fiocruz) for the technical and scientific support. This study was funded by the *Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro* (FAPERJ-BIOTA 2012), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES Parasitologia Básica/2011), PAEF/IOC/Fiocruz and *Conselho Nacional de Pesquisa* (CNPq). C.P.Santos was sponsored by fellowships from the *Conselho Nacional de Pesquisa* (CNPq) and R.C. Augusto from CAPES.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Bockarie, MJ, Kelly-Hope, LA, Rebollo, M & Molyneux, DH. 2013. *Preventive chemotherapy as a strategy for elimination of neglected tropical parasitic diseases: endgame challenges*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, vol.368, pp. 2012-2014.
- Braschi, S, Curwen, RS, Ashton, PD, Verjovski-Almeida, S & Wilson, A. 2006. *The tegument surface membranes of the human blood parasite Schistosoma mansoni: A proteomic analysis after differential extraction*. Proteomics, vol. 6, pp.1471-1482.
- Buron, I, James, E, Riggs-Gelasco, P, Ringwood, AH, Rolando, E & Richardson, D. 2009. *Overview of the status of heavy metal accumulation by helminths with a note on the use of in vitro culture of adult acanthocephalans to study the mechanism of bioaccumulation*. Neotropical Helminthology, vol.3, pp.101-110.
- Crignis, RDN, Terra, VR, Pani, G, Santos, JB, Silva, AG & Cruz ZMA. 2012. *Determination of LD₅₀ of the latex of Euphorbia splendens var. hislopii N.E.B (syn. Euphorbia milii Des Moul. var. splendens (Ursch & Leandri) against Achatina fulica (Bowdich, 1822)*. Natureza online, vol.10, pp.77-80.
- De-Carvalho, RR, Maldonado, Jr A, Oliveira-Filho, EC, Ribeiro, AC, Paumgarten, FJR, & Rey, L. 1998. *Effects of Euphorbia milii latex on Schistosoma mansoni eggs, miracidia and cercariae*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol.93, pp.235-237.
- Faghiri, Z, Camargo, SMR, Huggel, K, Forster, IC, Ndegwa, D, Verrey, F & Skelly, PJ. 2010. *The tegument of the human parasitic worm Schistosoma mansoni as an excretory organ: The Surface Aquaporin SmAQP Is a Lactate Transporte*. Plos One, 5:e10451.
- Galaktionov, A & Dobrovolskij, AA. 2003. *The Biology and evolution of Trematodes. An essay on the biology, morphology, life-cycles, transmissions and evolution of digenetic trematodes*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 592 pages.
- Giovanelli, A, Silva, CLPAC, Medeiros, L & Vasconcellos, MC. 2001. *The molluscicidal activity of the látex of Euphorbia splendens var. hislopii on*

- Melanoides tuberculata (Thiaridae), a snail associated with habitats of Biomphalaria glabrata (Planorbidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 96, pp.123-125.
- Goldstein, JI, Newbury, DE, Echlin, P, Joy, DC, Lyman, CE, Lifshin, E, Sawyer, L & Michael, JR. 2003. *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*. Springer, Berlin.
- Gonzalez-Mejia, ME, Torres-Rasgado, E, Porchia, LM, Salgado, HR, Totolhua, JL, Ortega, A, Hernández-Kelly, LC, Ruiz-Vivanco, G, Báez-Duarte, BG & Pérez-Fuentes, R. 2014. *Metallothionein-1 and nitric oxide expression are inversely correlated in a murine model of Chagas disease*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol.109, pp.174-181.
- Hamed, MA. 2010. *Strategic control of schistosome intermediate host*. Asian Journal of Epidemiology, vol.3, pp.123-140.
- Liang, YS, Coles, GC, Dai, JR, Zhu, YC & Doenhoff, MJ. 2001. *Biological characteristics of praziquantel-resistant and -susceptible isolates of Schistosoma mansoni*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, vol.95, pp.715-723.
- Lorsuwannarat, N, Saowakon, N, Ramasoota, P, Wanichanon, C & Sobhon P. 2013. *The anthelmintic effect of plumbagin on Schistosoma mansoni*. Experimental Parasitology, vol.133, pp.18-27.
- Lima, MG, Augusto, RC, Vasconcellos, MC, Mello-Silva, CC & Pinheiro, J. 2012. *Metabolic changes in Biomphalaria glabrata infected with Schistosoma mansoni exposed to latex of Euphorbia milii solution versus times of preparation*. Journal of Natural Products, vol.5, pp.222- 232.
- Mello-Silva, CC, Vasconcellos, MC, Bezerra, JCB, Rodrigues, MLA & Pinheiro J. 2011. *The influence of exposure to Euphorbia splendens var. hislopii latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in Biomphalaria glabrata infected with Schistosoma mansoni*. Acta Tropica, vol.117, pp.101-104.
- Mello-Silva, CC, Vilar, MM, Vasconcellos, MC, Pinheiro, J & Rodrigues, MLA. 2010. *Carbohydrate metabolism alterations in Biomphalaria glabrata infected with Schistosoma mansoni and exposed to Euphorbia splendens var. hislopii latex*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol.105, pp.492-495.
- Morais, AM & Malta, JCO. 2014. *Chemical analysis through “energy-dispersive spectroscopy (EDS)” of digenea metacercariae found infesting specimens of Hoplosternum littorale (Hancock, 1828) (Siluriformes: Callichthyidae), captured in Manaus polluted Igarapes*. Neotropical Helminthology, vol.8, pp.217-225.
- Morley, NJ, Crane, M & Lewis, JW. 2002. *Toxicity of cadmium and zinc mixtures to Diplostomum spathaceum (Trematoda: Diplostomidae) Cercarial Survival*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol.43, pp.28-33.
- Mwine, JT & Damme, PV. 2011. *Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features*. Journal of Medicinal Plants Research, vol.5, pp.652-662.
- Ribeiro-Paes, JT & Rodrigues, V. 1997. *Sex determination and female reproductive development in the Genus Schistosoma: A Review*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, vol.39, pp.337-344.
- Sambon, LW. 1907. *Remarks on Schistosoma mansoni*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol.10, pp.303-304.
- Schall, VT, Vasconcellos, MC, Villaça-Coelho, AL, Ferreira-Lopes, FE & Silva, IP. 1992. *Evaluation of temporal, seasonal and geographic stability of the*

- molluscicidal property of Euphorbia splendens latex*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, vol.34, pp.183-191.
- Shaw, MK & Erasmus, DA . 1984 . Schistosoma mansoni: *Electron probe X-ray microanalysis of the tegument and subtegumental tissues of adult worms*. Experimental Parasitology, vol.58, pp.163-181.
- Sigel, A, Sigel, H & Singel, RKO. 2009. *Metallothioneins and related chelators (Metal Ions in Life Sciences)*. Metal Ions in Life Sciences v. 5. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry.
- Singer, C, Zimmermann, S & Sures, B. 2005. *Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (Dreissena polymorpha) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): Comparison with lead and cadmium exposures*. Aquatic Toxicology, vol.75, pp.65-75.
- Singh, SK, Yadav, RP & Singh, A. 2010. *Molluscicides from some common medicinal plants of eastern Uttar Pradesh*. Journal of Applied Toxicology, vol.30, pp.1-7.
- Smyth, JD & Halton, DW. 1983. *The Physiology of Trematodes*. 2nd Ed. Cambridge University Press, Cambridge, 445 p.
- Sures, B, Zimmermann, S, Sonntag, C, Stuben, D & Taraschewski H. 2003. *The acanthocephalan Paratenuisentis anbiguus as a sensitive indicator of the precious metals Pt and Rh from automobile catalytic converters*. Environmental Pollution, vol.122, pp.401-405.
- Vasconcellos, MC & Amorim, A. 2003. *Molluscicidal action of the latex of Euphorbia splendens var. hislopianae* (“Christ’s Crown”) (Euphorbiaceae) against *Lymanea columella* (Say; 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae); *intermediate host of Fasciola hepatica* Linnaeus; 1758 (Trematode: Fasciolidae). 1: *Test in laboratory*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol.98, pp.557-563.
- Vasconcellos, MC & Schall, VT. 1986. *Latex of “Coroa de Cristo” (Euphorbia splendens): an effective molluscicide*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol.81, pp.475-476.
- WHO - World Health Organization. 2002. *Report and control of schistosomiasis and the soil-transmitted helminthiasis*. Geneva: World Health Organization.
- Xiao, S, Shen, B, Utzinger, J, Chollet, J & Tanner, M. 2002. *Ultrastructural alterations in adult Schistosoma mansoni caused by artemether*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol.97, pp.717-724.
- Xiao, SH, Chollet, J, Weiss, NA, Bergquist, RN & Tanner, M. 2000. *Preventive effect of artemether in experimental animals infected with Schistosoma mansoni*. Parasitology International, vol.49, pp.19-24.
- Yadav, SC & Jagannadham, MV. 2008. *Physiological changes and molluscicidal effects of crude latex and Milin on Biomphalaria glabrata*. Chemosphere, vol. 71, pp. 1295–1300.
- Zahra, NB, Ahmad, M, Shinwari, ZK, Zafar & M, Sultana, S. 2014. *Systematic significance of anatomical characterization in some Euphorbiaceous species*. Pakistan Journal of Botany, vol.46, pp.1653-1661.

Received December 28, 2015.

Accepted February 25, 2016.

ANEXO 2

Grupo	Spot ID	Match ID	Pixel X	Pixel Y	pI	Massa Molecular (MW)	Intensidade	Área	Volume	% Volume	Saliência
Controle	986	0	820	1363	5,13653	17401	0,057043	11,8098	0,162315	1,25705	0
Controle	979	69	756	1305	4,86468	18985	0,026005	0,781348	0,003668	0,028406	4,03303
Controle	971		720	1256	4,71177	20384	0,009347	0,290317	0,001138	0,008817	4,42295
Controle	960	55	549	1236	3,98544	20911	0,107734	5,0483	0,188667	1,46113	0
Controle	922	1	1495	1041	8,00364	26815	0,013901	1,37811	0,007473	0,057871	5,34039
Controle	920	2	936	1034	5,62925	27055	0,019534	3,14331	0,025891	0,200513	5,3359
Controle	918	53	843	1017	5,23422	27648	0,087482	9,37976	0,260506	2,01749	0
Controle	914		1022	996	5,99454	28399	0,024327	1,75445	0,012062	0,093417	4,75911
Controle	911	3	1172	988	6,63167	28690	0,013182	0,706081	0,005265	0,040772	4,00814
Controle	908	4	708	973	4,6608	29244	0,041104	4,7759	0,071982	0,557467	38,2872
Controle	905		1635	963	8,5983	29620	0,015579	0,274189	0,001378	0,01067	4,32004
Controle	904		1588	963	8,39867	29620	0,019893	1,72398	0,014645	0,113421	7,59059
Controle	903		1572	960	8,3307	29733	0,021451	1,87273	0,020083	0,155531	14,3979

Controle	900		1654	944	8,679	30491	0,032955	0,765219	0,004188	0,032434	4,65544
Controle	898	63	1452	943	7,821	30546	0,056683	20,367	0,347252	2,68929	0
Controle	884		1594	931	8,42415	31213	0,018335	1,01611	0,007383	0,057178	4,44771
Controle	877	5	959	916	5,72694	32068	0,02984	3,5089	0,030683	0,237626	10,0739
Controle	876		766	905	4,90716	32711	0,03703	3,24367	0,035169	0,272368	33,9266
Controle	875		901	886	5,48058	33850	0,01498	1,49281	0,010208	0,079054	7,60799
Controle	873	6	1017	884	5,9733	33972	0,034873	3,84043	0,040174	0,311129	30,7901
Controle	872	7	1708	879	8,90837	34280	0,01498	0,517912	0,002916	0,02258	20,025
Controle	871		979	883	5,81189	34033	0,020612	1,43008	0,011937	0,092443	5,51482
Controle	870		962	883	5,73968	34033	0,020852	1,28313	0,009997	0,077424	9,87341
Controle	869		933	883	5,6165	34033	0,021691	2,13616	0,01655	0,128168	10,901
Controle	868	68	760	868	4,88167	34966	0,032596	6,98375	0,082462	0,638628	15,8643
Controle	867		1667	857	8,73422	35666	0,008748	0,426516	0,001849	0,014319	5,11343
Controle	866	8	1015	850	5,96481	36119	0,018695	0,741922	0,004571	0,035403	4,14658
Controle	865		1180	843	6,66566	36577	0,015459	1,1541	0,006762	0,052366	5,80734
Controle	864	120	1321	831	7,26456	37377	0,011145	0,741922	0,003365	0,026063	4,32657

Controle	863		1020	826	5,98604	37715	0,023968	1,99638	0,012869	0,099664	11,5138
Controle	862		1525	819	8,13107	38194	0,012583	0,374545	0,003099	0,023998	5,70941
Controle	861		1490	819	7,9824	38194	0,017736	1,9247	0,014521	0,112456	9,48901
Controle	860	9	1308	817	7,20934	38332	0,03679	1,17023	0,010174	0,078789	9,41069
Controle	858	91	1216	794	6,81857	39954	0,011504	0,345872	0,001567	0,012138	6,64907
Controle	857	71	954	794	5,7057	39954	0,028641	2,45515	0,018311	0,141806	0
Controle	856		1696	791	8,8574	40170	0,012703	0,480278	0,002355	0,01824	17,9121
Controle	854	10	1494	776	7,99939	41271	0,017856	2,22397	0,017614	0,136408	7,88253
Controle	853	11	855	774	5,28519	41420	0,011385	1,74549	0,008697	0,067353	5,23385
Controle	852		426	764	3,46299	42173	0,035712	0,281357	0,00376	0,029116	47,4756
Controle	851		1585	760	8,38592	42478	0,010785	0,340496	0,001451	0,011234	4,23892
Controle	850		669	760	4,49515	42478	0,032956	0,29211	0,004007	0,031035	73,947
Controle	847	92	990	746	5,85862	43564	0,015819	1,89244	0,015552	0,120443	5,55133
Controle	846	12	568	751	4,06614	43173	0,048894	2,37451	0,021612	0,167377	29,0869
Controle	845	13	1028	746	6,02002	43564	0,021211	2,26519	0,015741	0,121906	8,35108
Controle	844	14	1487	737	7,96966	44276	0,028641	0,620061	0,00672	0,052045	55,3024

Controle	842	93	413	720	3,40777	45760	0,025046	0,358417	0,002015	0,015608	5,8231
Controle	841		825	720	5,15777	45760	0,015219	1,28672	0,007125	0,05518	4,68031
Controle	840	121	1187	711	6,69539	46630	0,024567	0,73117	0,003241	0,025096	5,32069
Controle	838		1661	709	8,70874	46825	0,051171	0,575259	0,003011	0,023318	6,52863
Controle	834	73	358	708	3,17415	46924	0,024807	2,83508	0,028342	0,219495	0
Controle	831		1022	703	5,99454	47417	0,039786	2,03401	0,020572	0,15932	23,7471
Controle	829	94	986	703	5,84163	47417	0,027802	2,33688	0,026457	0,204894	28,4468
Controle	827		1330	694	7,30279	48319	0,024087	0,625437	0,003115	0,024125	4,61272
Controle	825		779	689	4,96238	48827	0,023488	0,476694	0,004404	0,034109	15,1317
Controle	824		1396	687	7,58313	49032	0,018455	1,77237	0,014894	0,115343	5,01097
Controle	823		1594	690	8,42415	48725	0,024807	1,23654	0,009978	0,077274	5,78703
Controle	822		1056	685	6,13896	49237	0,013302	1,13797	0,006822	0,05283	4,19976
Controle	821		789	685	5,00485	49237	0,017856	0,252684	0,002108	0,016326	10,51
Controle	820		703	687	4,63956	49032	0,035951	0,829734	0,013158	0,101901	12,027
Controle	819		319	694	3,0085	48319	0,016777	2,05014	0,014163	0,109688	7,97683
Controle	818		809	681	5,08981	49651	0,05189	0,756259	0,013044	0,101018	98,6995

Controle	817		1639	683	8,61529	49444	0,018335	1,82434	0,011951	0,092554	22,262
Controle	816		1577	689	8,35194	48827	0,025765	4,30279	0,040281	0,311954	16,8203
Controle	815		423	678	3,45024	49964	0,041704	1,47668	0,010163	0,078708	8,87154
Controle	814		763	682	4,89442	49548	0,020373	1,24371	0,009477	0,073397	21,3
Controle	813	15	1479	683	7,93568	49444	0,023608	3,51248	0,028611	0,221577	22,5209
Controle	811		489	676	3,73058	50174	0,009827	0,582427	0,002348	0,018181	5,28001
Controle	809	95	857	671	5,29369	50701	0,016897	0,822566	0,006227	0,048226	7,68324
Controle	808		834	669	5,196	50914	0,016538	0,320783	0,002233	0,017296	5,8926
Controle	807		1358	671	7,42172	50701	0,018695	0,931883	0,007808	0,060471	10,523
Controle	804		705	670	4,64806	50808	0,028761	1,95158	0,030437	0,235721	7,8002
Controle	802		402	665	3,36104	51342	0,027802	0,499991	0,003018	0,023375	4,83176
Controle	801	77	353	679	3,15291	49860	0,042423	4,19527	0,059446	0,46038	13,7752
Controle	799		1702	658	8,88289	52100	0,021451	0,854824	0,00436	0,03377	5,73645
Controle	798	96	1732	661	9,01032	51774	0,008868	0,763427	0,003046	0,023593	4,9497
Controle	797		1684	659	8,80643	51991	0,014261	0,935467	0,006444	0,049903	13,8866
Controle	796	97	1342	661	7,35376	51774	0,018335	1,43904	0,015939	0,123437	5,89716

Controle	792	81	1601	656	8,45388	52318	0,030199	3,01428	0,032808	0,254085	0
Controle	791		1358	656	7,42172	52318	0,023488	1,1093	0,010993	0,085138	5,65968
Controle	790	16	1265	657	7,0267	52209	0,026364	3,10747	0,029122	0,225537	4,28297
Controle	788	17	1439	653	7,76578	52648	0,02972	1,62183	0,016781	0,129956	14,2336
Controle	786	18	1228	649	6,86954	53090	0,017616	0,526872	0,002945	0,022811	7,68225
Controle	784		306	650	2,95328	52980	0,045059	0,763427	0,009879	0,076504	71,514
Controle	783	67	1495	649	8,00364	53090	0,061477	3,06267	0,030109	0,233182	16,6661
Controle	780	98	1037	651	6,05825	52869	0,230089	2,73293	0,364322	2,82149	0
Controle	777		1706	637	8,89988	54441	0,017496	0,365585	0,001302	0,010082	4,5822
Controle	776	19	1087	648	6,27063	53202	0,218585	5,7956	0,378323	2,92992	0
Controle	774	20	350	636	3,14017	54555	0,057043	2,48383	0,057788	0,447536	87,9738
Controle	773		595	628	4,18083	55476	0,029121	0,8602	0,006108	0,047303	6,84366
Controle	772	74	389	630	3,30583	55244	0,054646	1,24191	0,027808	0,215355	4,3009
Controle	768		783	627	4,97937	55592	0,025046	1,53402	0,013988	0,10833	4,62895
Controle	767		765	626	4,90291	55709	0,018934	1,54478	0,013454	0,104197	6,04142
Controle	766		540	626	3,94721	55709	0,019773	1,25983	0,011566	0,08957	4,80679

Controle	765		412	629	3,40352	55360	0,054886	1,65947	0,048557	0,376049	20,4381
Controle	764		1644	624	8,63653	55942	0,012224	0,928299	0,004925	0,038144	6,26076
Controle	763	21	925	634	5,58252	54784	0,930902	3,74008	1,41231	10,9376	0
Controle	762	83	709	626	4,66505	55709	0,035113	3,35299	0,048067	0,372254	12,9933
Controle	761		518	624	3,85376	55942	0,027443	0,885289	0,007189	0,055674	5,16302
Controle	760	62	454	627	3,58192	55592	0,058721	3,52324	0,078526	0,608145	0
Controle	759	58	999	633	5,89684	54898	0,965535	4,26695	1,51771	11,7539	0
Controle	756		1608	614	8,48362	57125	0,018575	0,593179	0,003787	0,029327	5,32682
Controle	755	54	962	636	5,73968	54555	1,09592	3,33327	1,92796	14,9311	0
Controle	754	22	666	628	4,4824	55476	0,215828	7,14862	0,588928	4,56095	0
Controle	753		1587	611	8,39442	57485	0,028881	1,80284	0,011561	0,08953	11,0615
Controle	752	25	1143	606	6,5085	58090	0,038947	0,345872	0,003289	0,025475	31,3741
Controle	751		1607	602	8,47937	58578	0,0151	0,306446	0,001916	0,014839	9,11383
Controle	750	99	1522	607	8,11833	57968	0,017736	3,00532	0,025304	0,195966	9,5194
Controle	749	100	1458	609	7,84648	57726	0,02229	2,86912	0,022979	0,177963	11,1531
Controle	748		1715	602	8,93811	58578	0,030079	0,594972	0,002771	0,021462	4,56433

Controle	746		738	590	4,78823	60068	0,034513	0,234763	0,003088	0,023915	61,1757
Controle	745		1646	587	8,64502	60446	0,015339	0,60214	0,003485	0,026989	21,9586
Controle	743		1424	578	7,70206	61596	0,012104	0,747299	0,003871	0,029983	5,48957
Controle	742		702	578	4,63532	61596	0,024926	0,405011	0,003318	0,0257	32,6084
Controle	741	79	1305	581	7,1966	61210	0,033675	4,41569	0,05945	0,460414	27,7549
Controle	739	23	1260	581	7,00546	61210	0,04422	2,99278	0,051026	0,395171	29,8016
Controle	738	75	1220	578	6,83556	61596	0,030918	2,02505	0,030477	0,236032	0
Controle	737		720	573	4,71177	62244	0,036071	0,725794	0,00903	0,069936	48,0875
Controle	736	24	1177	578	6,65291	61596	0,027323	2,25802	0,025824	0,199994	22,9939
Controle	735	25	1136	576	6,47876	61854	0,020972	1,95875	0,018522	0,143442	8,29284
Controle	734		709	569	4,66505	62767	0,020373	0,186377	0,002022	0,015659	11,5932
Controle	733		981	563	5,82039	63560	0,016777	0,967725	0,006792	0,052602	4,17303
Controle	732		1442	562	7,77852	63693	0,022649	0,379922	0,003001	0,023243	25,0452
Controle	731		1652	561	8,67051	63827	0,012943	0,793893	0,005432	0,042068	4,17629
Controle	729	26	710	555	4,6693	64633	0,094313	1,93366	0,024038	0,186164	4,27229
Controle	728	65	881	556	5,39563	64498	0,029001	3,98738	0,046378	0,359174	23,6156

Controle	727		1431	553	7,7318	64904	0,023968	0,283149	0,002841	0,022001	34,9471
Controle	723		1025	544	6,00728	66135	0,015699	1,46055	0,011173	0,08653	7,04177
Controle	718		1635	532	8,5983	67771	0,013542	1,17023	0,006702	0,051902	4,82544
Controle	717	101	979	534	5,81189	67496	0,018455	0,973101	0,00963	0,07458	11,5375
Controle	716		953	533	5,70146	67633	0,021691	0,499991	0,005774	0,044715	7,04965
Controle	713		1705	529	8,89563	68187	0,039427	0,652318	0,002922	0,022633	9,94455
Controle	710	61	840	527	5,22148	68465	0,083287	4,26695	0,135718	1,05107	0
Controle	708	102	661	515	4,46116	70160	0,025885	1,50714	0,017823	0,138031	6,84686
Controle	706		1345	516	7,3665	70017	0,019653	0,765219	0,004143	0,032082	5,98073
Controle	704	27	1089	512	6,27913	70590	0,071783	1,67739	0,056159	0,434927	76,793
Controle	702		1300	506	7,17536	71458	0,014381	0,55913	0,003871	0,029983	5,47141
Controle	701		1170	509	6,62318	71023	0,043741	2,18634	0,039054	0,302451	37,0089
Controle	700	28	1130	509	6,45328	71023	0,063035	1,63976	0,043179	0,334403	68,5391
Controle	699	57	1041	509	6,07524	71023	0,074419	4,40136	0,099083	0,767348	0
Controle	698	29	1289	507	7,12864	71313	0,01498	0,65411	0,004459	0,034532	7,53863
Controle	697	30	1217	507	6,82282	71313	0,02241	0,930091	0,009175	0,071056	13,6564

Controle	696	82	1238	506	6,91201	71458	0,026844	3,63434	0,030917	0,239437	20,1604
Controle	695	64	930	508	5,60376	71167	0,034274	4,35297	0,071344	0,552527	21,9316
Controle	694		886	505	5,41687	71604	0,037629	2,12899	0,032496	0,251665	10,7409
Controle	693		704	508	4,64381	71167	0,038109	4,1415	0,054498	0,422057	16,3006
Controle	690	103	702	488	4,63532	74127	0,030199	2,2401	0,032516	0,251819	8,56336
Controle	685		1406	484	7,62561	74734	0,013662	0,508952	0,003143	0,024339	7,49254
Controle	684		1444	482	7,78701	75039	0,0151	2,29028	0,015455	0,119693	4,67245
Controle	683		1420	483	7,68507	74886	0,019534	0,698912	0,00524	0,040581	4,76808
Controle	682		1385	482	7,53641	75039	0,015939	0,840487	0,00619	0,047937	9,49789
Controle	681		1370	482	7,47269	75039	0,018335	1,01253	0,00629	0,04871	5,49008
Controle	680	104	1341	480	7,34951	75345	0,012703	1,60212	0,008804	0,068182	4,59405
Controle	679		1288	479	7,12439	75499	0,016178	0,736546	0,005622	0,043538	5,34641
Controle	678		1663	473	8,71723	76428	0,011504	0,768804	0,00361	0,027955	7,90871
Controle	677	105	1060	474	6,15595	76272	0,02229	1,03941	0,009295	0,071989	19,8166
Controle	676	31	1042	474	6,07949	76272	0,021691	0,695328	0,008813	0,068255	5,1533
Controle	675		1158	475	6,57221	76117	0,020373	1,27596	0,011851	0,091781	12,0804

Controle	674	32	1143	473	6,5085	76428	0,015699	0,643358	0,005225	0,040466	4,60209
Controle	673		990	471	5,85862	76740	0,02229	1,02866	0,011612	0,089926	13,9005
Controle	671		1126	472	6,43629	76583	0,023968	0,885289	0,008287	0,064177	4,7974
Controle	670	122	1109	473	6,36408	76428	0,027563	1,3136	0,016845	0,130455	5,6171
Controle	669	33	968	472	5,76517	76583	0,026844	1,56807	0,021903	0,169627	23,6716
Controle	668	106	937	469	5,6335	77053	0,030798	2,9659	0,038111	0,295149	0
Controle	667	107	1023	470	5,99879	76896	0,035113	2,6487	0,032129	0,248822	15,3098
Controle	666	108	705	460	4,64806	78479	0,040505	2,19709	0,029123	0,225542	6,13593
Controle	658	34	882	451	5,39988	79931	0,050092	0,584219	0,003587	0,027782	6,28412
Controle	657		991	458	5,86286	78799	0,026005	0,894249	0,008326	0,064478	9,09883
Controle	656		1696	452	8,8574	79768	0,041104	0,43906	0,00278	0,021532	16,6623
Controle	655		1566	449	8,30522	80257	0,00767	0,64515	0,002403	0,018608	4,26161
Controle	654		1291	450	7,13714	80094	0,010546	1,24012	0,006922	0,05361	5,1348
Controle	653		1356	444	7,41323	81079	0,011025	0,679199	0,00248	0,01921	7,62987
Controle	650		1094	432	6,30036	83086	0,042063	0,272397	0,005842	0,045241	6,81823
Controle	649		1083	432	6,25364	83086	0,033075	1,16844	0,01894	0,14668	4,42476

Controle	648		1583	428	8,37743	83766	0,026844	0,456981	0,005454	0,042239	33,3618
Controle	647	35	1287	430	7,12015	83425	0,013062	1,13439	0,00713	0,055218	6,4063
Controle	646		1177	430	6,65291	83425	0,031038	1,52685	0,020487	0,158662	13,9108
Controle	645	36	1146	429	6,52124	83595	0,043142	1,38886	0,027325	0,211615	5,57865
Controle	644		1121	429	6,41505	83595	0,043621	0,578843	0,013344	0,10334	14,0524
Controle	643		1106	429	6,35134	83595	0,04434	1,00357	0,01981	0,153417	6,64588
Controle	642		1214	430	6,81007	83425	0,023368	0,969517	0,006811	0,052745	11,3923
Controle	641	123	794	422	5,02609	84796	0,017976	0,464149	0,002712	0,021001	4,19442
Controle	640	76	1019	422	5,9818	84796	0,106656	1,49818	0,058067	0,449698	92,4341
Controle	639	70	992	421	5,86711	84969	0,149318	1,5842	0,104015	0,805547	204,5
Controle	638	37	962	418	5,73968	85490	0,110251	1,35481	0,060351	0,467389	93,0372
Controle	637	66	934	417	5,62075	85664	0,075258	2,45157	0,060084	0,46532	69,2319
Controle	636	38	909	415	5,51456	86014	0,056084	1,21145	0,023681	0,183397	5,44478
Controle	634	78	706	411	4,65231	86718	0,027922	1,46951	0,017319	0,134126	5,28098
Controle	630		1087	397	6,27063	89227	0,030079	0,43906	0,003067	0,023752	9,05095
Controle	629		1220	397	6,83556	89227	0,016418	1,91394	0,013338	0,103298	8,36773

Controle	628	39	1017	396	5,9733	89409	0,040625	1,17023	0,023	0,178124	22,888
Controle	627	109	906	391	5,50182	90324	0,025166	0,944428	0,009205	0,071287	9,49674
Controle	626		705	383	4,64806	91808	0,03727	1,31001	0,017615	0,136421	5,24697
Controle	617		662	368	4,46541	94657	0,028881	1,54657	0,010721	0,083027	9,29992
Controle	616	56	819	368	5,13228	94657	0,049253	2,44619	0,035864	0,277749	42,542
Controle	615	72	960	363	5,73119	95626	0,0592	1,72757	0,040021	0,309939	133,362
Controle	614	59	934	362	5,62075	95821	0,046857	1,66664	0,034265	0,265368	106,994
Controle	613	40	991	362	5,86286	95821	0,040625	1,46055	0,026528	0,205448	73,3012
Controle	612	41	1018	359	5,97755	96409	0,047576	2,4677	0,050179	0,388613	69,7139
Controle	611	110	663	354	4,46966	97396	0,012224	0,620061	0,003214	0,024892	4,01309
Controle	610		1089	354	6,27913	97396	0,024327	1,17202	0,01024	0,079305	10,2811
Controle	609		1063	353	6,16869	97595	0,040026	1,23833	0,016188	0,125368	8,66987
Controle	598	111	750	338	4,8392	100623	0,025286	0,397842	0,002003	0,015516	18,6125
Controle	597	42	1020	335	5,98604	101240	0,173645	0,788516	0,030278	0,234489	62,614
Controle	595		934	332	5,62075	101861	0,057882	1,32793	0,0317	0,245502	5,44577
Controle	594	112	823	333	5,14927	101653	0,010905	0,770596	0,004653	0,036037	4,52913

Controle	593	113	658	332	4,44842	101861	0,019174	1,27417	0,010537	0,081605	6,74298
Controle	591	43	990	333	5,85862	101653	0,13338	1,85839	0,121809	0,943349	82,4888
Controle	589	44	873	323	5,36165	103746	0,018575	0,360209	0,002887	0,022359	24,7462
Controle	588	114	706	340	4,65231	100214	0,037509	4,43899	0,072839	0,564103	7,06623
Controle	577	45	867	312	5,33616	106097	0,032955	0,397842	0,003178	0,024615	11,1396
Controle	576	46	1012	311	5,95206	106313	0,231767	1,25087	0,094033	0,728237	5,43679
Controle	575		851	311	5,2682	106313	0,024807	0,670239	0,006183	0,047887	21,3513
Controle	571	47	987	309	5,84587	106747	0,257172	2,32075	0,253075	1,95994	548,428
Controle	566	115	932	295	5,61226	109836	0,082089	0,668447	0,024559	0,190198	25,8437
Controle	562	116	705	283	4,64806	112554	0,062795	4,72214	0,130109	1,00763	0
Controle	561		1088	289	6,27488	111187	0,019294	1,06629	0,009188	0,071157	15,0813
Controle	560		1140	287	6,49575	111641	0,012224	0,8602	0,004924	0,038131	8,41207
Controle	559		1054	285	6,13046	112097	0,054526	0,33512	0,003278	0,025386	5,88481
Controle	558		973	280	5,78641	113244	0,153153	0,392466	0,029916	0,231685	46,7825
Controle	557	48	955	281	5,70995	113014	0,282338	1,67201	0,160977	1,24668	203,602
Controle	555		975	271	5,7949	115340	0,147161	0,399634	0,027952	0,216476	4,70823

Controle	554	117	989	270	5,85437	115575	0,137694	1,086	0,0785	0,607945	211,762
Controle	553	49	1008	264	5,93507	116997	0,120677	0,706081	0,033871	0,262316	9,85356
Controle	552		1035	264	6,04976	116997	0,107734	0,74013	0,02993	0,231791	6,01751
Controle	551	50	1019	266	5,9818	116521	0,134338	0,630813	0,028426	0,220149	7,76225
Controle	549	51	1056	262	6,13896	117474	0,052968	0,405011	0,009769	0,075656	7,97143
Controle	548		1085	262	6,26214	117474	0,038228	1,2222	0,017132	0,132681	50,0786
Controle	547	124	1068	261	6,18993	117714	0,042782	0,684576	0,010634	0,082355	7,9663
Controle	544		934	246	5,62075	121367	0,056444	1,45338	0,019699	0,152556	8,57662
Controle	543	60	992	244	5,86711	121862	0,093594	0,786724	0,038643	0,299271	64,3522
Controle	542		978	243	5,80765	122111	0,105338	0,827942	0,044731	0,346416	31,4164
Controle	541		664	238	4,47391	123361	0,091077	0,944428	0,004612	0,035719	5,12085
Controle	539	118	900	237	5,47634	123613	0,021331	0,770596	0,005832	0,045164	10,3681
Controle	536		1087	234	6,27063	124371	0,040385	0,8602	0,011022	0,085359	30,9769
Controle	535		1066	229	6,18143	125644	0,030319	0,60214	0,006846	0,053016	8,02282
Controle	534	52	1057	232	6,1432	124878	0,028402	0,379922	0,004299	0,033296	19,1421
Controle	532	119	821	228	5,14078	125900	0,019174	0,485654	0,002638	0,020428	4,85438

Controle	531	125	663	226	4,46966	126414	0,013781	1,05733	0,006444	0,049908	6,06874
Controle	528	126	1085	213	6,26214	129807	0,019893	0,729378	0,007619	0,059007	8,70656
Controle	526		900	212	5,47634	130072	0,017017	0,573467	0,005416	0,041948	7,00389
Controle	523		1085	202	6,26214	132749	0,023249	0,340496	0,004088	0,031659	15,3994
Controle	522	127	1058	195	6,14745	134656	0,023368	1,29388	0,011611	0,089918	12,9626
Controle	521		1110	198	6,36833	133835	0,020013	0,623645	0,004376	0,033888	28,5956
Controle	520	80	900	189	5,47634	136312	0,026484	1,33869	0,011192	0,086673	4,20467
Controle	517		1086	189	6,26638	136312	0,027083	1,50177	0,016781	0,129956	9,26797
Controle	513		997	152	5,88835	146985	0,5032	2,30999	0,381464	2,95425	565,642
Controle	511		980	152	5,81614	146985	0,49565	3,63793	0,423801	3,28213	432,796
Controle	509	128	1086	147	6,26638	148489	0,018455	0,564506	0,004939	0,038254	11,7693
Controle	1003	21	919	549	5,64557	54304	0,746231	3,27055	0,757676	7,41257	0
Controle	914		910	1229	5,60759	17155	0,018695	0,686368	0,003414	0,033403	4,19834
Controle	908	0	835	1204	5,29114	17814	0,026604	6,86009	0,07571	0,740695	13,4975
Controle	872	55	551	1080	4,09283	21320	0,083527	3,93004	0,11869	1,16118	125,032
Controle	847	3	1120	933	6,49367	25960	0,013062	2,29745	0,012068	0,118067	4,32686

Controle	846		995	926	5,96624	26204	0,007909	0,421139	0,001565	0,01531	4,58636
Controle	845		773	926	5,02954	26204	0,011145	1,13439	0,005715	0,055916	6,22173
Controle	841	53	853	905	5,36709	26952	0,082688	10,7095	0,180994	1,77072	0
Controle	840		1353	904	7,47679	26988	0,00743	0,281357	8,52E-04	0,008339	4,34706
Controle	826	4	709	850	4,75949	29012	0,068188	6,05366	0,092262	0,902623	39,4675
Controle	824		1503	841	8,1097	29364	0,024447	0,693536	0,003654	0,035752	7,03327
Controle	821	63	1437	841	7,83122	29364	0,051411	6,68805	0,070068	0,6855	0
Controle	815		1292	823	7,21941	30124	0,012703	0,951596	0,005999	0,058694	4,41523
Controle	811		1411	815	7,72152	30624	0,016658	0,369169	0,002205	0,021567	15,549
Controle	804	68	766	793	5	32042	0,032716	4,13254	0,058805	0,575303	32,1708
Controle	801	120	1330	775	7,37975	33252	0,009707	0,492823	0,00201	0,01966	7,83934
Controle	740	13	1092	691	6,37553	39527	0,016777	2,67379	2,13E-02	0,207967	9,04604
Controle	737	12	595	659	4,27848	42218	0,050452	2,98203	0,024762	0,242254	25,1639
Controle	736	121	1201	642	6,83544	43722	0,036071	0,437268	0,002088	0,020427	9,26402
Controle	735		1537	640	8,25316	43902	0,011385	0,948012	0,004912	0,048055	4,65331
Controle	730		1601	630	8,52321	44815	0,017017	0,786724	0,005719	0,055951	20,2084

Controle	728		1636	627	8,67089	45107	0,011265	1,58958	0,009138	0,089396	9,0515
Controle	727		1586	625	8,45992	45322	0,017736	3,0322	0,022377	0,21892	7,19614
Controle	725	94	986	620	5,92827	45865	0,023249	1,58779	0,013057	0,127744	12,7696
Controle	721	73	352	608	3,25316	47193	0,019294	2,70605	0,021588	0,211201	6,81063
Controle	720	93	391	604	3,41772	47644	0,029121	1,03941	0,006625	0,064816	4,99853
Controle	717	97	1306	597	7,27848	48444	0,014381	0,921131	0,007118	0,06964	4,22764
Controle	716		1610	597	8,56118	48444	0,020013	2,58239	0,01728	0,169053	12,6281
Controle	713	81	1498	592	8,08861	49024	0,017017	2,38347	0,0165	0,161428	0
Controle	712		1309	586	7,29114	49728	0,015219	1,00715	0,006545	0,064028	5,08184
Controle	711		1324	582	7,35443	50204	0,016658	0,749091	0,005409	0,052917	5,73072
Controle	710		707	586	4,75105	49728	0,020253	1,52148	0,013783	0,134844	14,8454
Controle	709	16	1262	584	7,09283	49965	0,013901	2,0824	0,013901	0,135997	4,80015
Controle	708		1165	583	6,68354	50084	0,019893	1,16306	0,009831	0,096184	11,5065
Controle	705	19	1091	575	6,37131	51047	0,208638	4,62537	0,322404	3,15418	0
Controle	702	98	1054	571	6,21519	51535	0,234763	2,01968	0,250482	2,45055	274,631
Controle	699	58	996	556	5,97046	53407	0,848094	4,75081	1,48882	14,5656	0

Controle	698	20	348	549	3,23629	54304	0,110251	2,72397	0,067685	0,662187	107,288
Controle	696	54	956	558	5,80169	53153	1,00999	2,68275	1,44771	14,1634	0
Controle	695	74	404	543	3,47257	55084	0,047815	1,59137	0,0287	0,280779	16,1836
Controle	693	83	710	546	4,76371	54693	0,03727	4,87626	0,078823	0,771154	8,21253
Controle	692		550	543	4,08861	55084	0,014141	2,5125	0,013834	0,135342	4,43386
Controle	690		422	544	3,54852	54953	0,046138	0,897834	0,022293	0,218098	13,3793
Controle	689		438	542	3,61603	55215	0,048175	0,724001	0,017965	0,175756	13,9476
Controle	688	62	471	542	3,75527	55215	0,054646	3,15227	0,078545	0,768427	0
Controle	686	100	1410	529	7,7173	56950	0,013662	1,07167	0,005817	0,056907	5,95832
Controle	684	24	1181	526	6,75105	57357	0,017137	1,78133	0,014067	0,137619	13,5498
Controle	683	25	1149	526	6,61603	57357	0,013062	1,75803	0,010846	0,10611	7,13473
Controle	681	79	1324	527	7,35443	57221	0,027802	3,25801	0,036073	0,352915	0
Controle	680	75	1220	525	6,91561	57494	0,030199	2,14692	0,022422	0,219365	18,7985
Controle	679	23	1264	525	7,10127	57494	0,041224	2,09494	0,026423	0,258502	43,7024
Controle	678	22	662	542	4,56118	55215	0,257891	6,47838	0,59955	5,86558	0
Controle	671	101	987	476	5,93249	64602	0,015219	1,26879	0,009004	0,088091	6,16667

Controle	669	28	1141	465	6,58228	66277	0,043981	1,66664	0,027815	0,272125	45,2997
Controle	667	61	830	463	5,27004	66555	0,074419	3,45514	0,091584	0,895992	54,9515
Controle	666		1178	462	6,7384	66694	0,027922	1,96771	0,020341	0,199006	29,1658
Controle	665	30	1222	460	6,92405	66974	0,012703	0,727586	0,004924	0,048175	5,77075
Controle	664	82	1272	459	7,13502	67114	0,015339	3,79205	0,02519	0,246437	0
Controle	662	27	1101	462	6,4135	66694	0,073221	2,80819	0,081071	0,793144	115,901
Controle	658	57	1052	458	6,20675	67255	0,064233	3,63076	0,106482	1,04175	0
Controle	657		955	451	5,79747	68247	0,011624	1,00715	0,004565	0,044656	6,50091
Controle	656		987	451	5,93249	68247	0,018335	1,27059	0,009546	0,093392	25,4219
Controle	652		916	444	5,63291	69254	0,023249	1,80821	0,017285	0,1691	29,3188
Controle	651		1433	441	7,81435	69691	0,010905	0,582427	0,003414	0,033401	4,09003
Controle	650	102	658	444	4,5443	69254	0,032596	2,16304	0,036065	0,352831	8,17317
Controle	649		707	445	4,75105	69110	0,026724	3,1003	0,040729	0,398466	18,4487
Controle	648		888	441	5,51477	69691	0,030439	2,81895	0,038966	0,381212	21,4803
Controle	646		1378	440	7,58228	69837	0,013422	1,62363	0,01011	0,098907	5,93728
Controle	645		1357	438	7,49367	70129	0,013182	0,960556	0,006466	0,063257	6,52343

Controle	644	122	1120	433	6,49367	70867	0,062316	1,32256	0,013009	0,127267	7,39637
Controle	642		707	428	4,75105	71613	0,033555	2,03581	0,034812	0,340573	4,22568
Controle	640	107	1046	426	6,18143	71913	0,026844	2,68275	0,029542	0,289013	38,5784
Controle	638	64	954	418	5,79325	73127	0,028641	3,00891	0,038183	0,373556	37,7854
Controle	636	123	785	410	5,08017	74362	0,008748	0,967725	0,004135	0,040452	4,2974
Controle	635	103	714	406	4,78059	74987	0,033675	1,79925	0,029433	0,287952	0
Controle	632	33	987	419	5,93249	72974	0,031637	1,95516	0,022732	0,222389	35,623
Controle	631		658	410	4,5443	74362	0,025645	2,12003	0,024109	0,235869	7,84829
Controle	626		1170	391	6,70464	77378	0,030439	1,51969	0,019791	0,193619	6,86683
Controle	625		1149	392	6,61603	77216	0,032596	0,584219	0,009497	0,092911	12,3917
Controle	624		1136	390	6,56118	77540	0,032956	0,704289	0,011557	0,113064	16,0008
Controle	622	36	1113	387	6,46414	78028	0,042543	2,45336	0,040825	0,399407	51,775
Controle	621		1087	386	6,35443	78192	0,039786	1,09855	0,014718	0,143994	10,3996
Controle	620	108	709	385	4,75949	78355	0,038708	1,57524	0,024917	0,243769	5,62497
Controle	616	76	1039	379	6,1519	79346	0,062555	2,05193	0,048831	0,477724	54,2339
Controle	615		712	372	4,77215	80516	0,032236	0,736546	0,013215	0,129284	11,6706

Controle	614		1017	376	6,05907	79845	0,079213	1,16844	0,046185	0,451841	64,1559
Controle	613	70	988	375	5,93671	80012	0,128946	1,19711	0,059264	0,579794	275,511
Controle	612	37	955	372	5,79747	80516	0,092515	1,82613	0,065693	0,642693	94,0828
Controle	611	66	917	367	5,63713	81363	0,060039	1,19532	0,01771	0,173266	6,5365
Controle	609	78	707	362	4,75105	82219	0,046737	1,58958	0,023108	0,226074	5,27833
Controle	608	39	1043	358	6,16878	82910	0,036431	1,30464	0,023052	0,225526	7,54019
Controle	603		658	337	4,5443	86635	0,030679	1,71682	0,017129	0,167576	8,65361
Controle	598	72	954	327	5,79325	88467	0,054526	1,94083	0,036597	0,358044	59,3082
Controle	597	40	986	327	5,92827	88467	0,046258	1,43725	0,027998	0,273915	113,671
Controle	596	56	821	323	5,23207	89211	0,08161	1,56807	0,032832	0,321208	32,6067
Controle	595		659	324	4,54852	89024	0,024207	0,761635	0,009489	0,092831	9,91819
Controle	593	41	1042	322	6,16456	89398	0,082688	3,1021	0,092722	0,90713	134,86
Controle	591		1110	321	6,45148	89585	0,023488	1,59675	0,019546	0,191222	5,36299
Controle	590	59	920	321	5,64979	89585	0,040385	2,36555	0,038587	0,377508	8,47307
Controle	589		658	311	4,5443	91480	0,045538	1,39782	0,015336	0,150039	6,55361
Controle	587		1015	301	6,05063	93414	0,073341	0,288525	0,013671	0,133751	5,19293

Controle	586	42	1043	302	6,16878	93219	0,087482	1,75624	0,077425	0,75747	94,3143
Controle	585		954	300	5,79325	93610	0,076217	1,00357	0,0383	0,374699	33,4881
Controle	584		987	300	5,93249	93610	0,116003	1,36378	0,085549	0,836951	137,303
Controle	581		955	279	5,79747	97815	0,23668	1,46413	0,132616	1,29743	16,7546
Controle	580	113	658	279	4,5443	97815	0,012823	0,756259	0,004358	0,042639	4,27221
Controle	578		1048	279	6,18987	97815	0,081849	0,715041	0,021821	0,21348	77,0326
Controle	573		984	278	5,91983	98020	0,3993	1,8333	0,224454	2,19591	811,829
Controle	572	115	924	268	5,66667	100093	0,068907	0,582427	0,018036	0,176453	5,64553
Controle	571		1139	267	6,57384	100303	0,019893	1,14693	0,008398	0,082162	27,9705
Controle	570	116	709	255	4,75949	102854	0,107135	7,01063	0,275606	2,69634	0
Controle	569		1111	265	6,4557	100724	0,027083	1,39424	0,020582	0,201361	25,6055
Controle	566	117	983	250	5,91561	103935	0,099945	0,853031	0,028379	0,277642	7,51023
Controle	565		957	256	5,80591	102639	0,16981	0,924715	0,072809	0,712312	68,3135
Controle	561		944	256	5,75105	102639	0,188026	0,813606	0,049005	0,479434	80,2882
Controle	557		1004	243	6,00422	105469	0,060878	0,636189	0,014277	0,139681	24,4705
Controle	555		1018	241	6,06329	105912	0,053568	0,476694	0,010716	0,104834	32,6608

Controle	553		1140	241	6,57806	105912	0,011385	0,650526	0,003671	0,035916	6,17691
Controle	552		1047	241	6,18565	105912	0,069386	1,50177	0,036177	0,353934	95,8983
Controle	551		1030	240	6,11392	106133	0,057283	0,480278	0,012213	0,119481	37,8845
Controle	550	124	1083	239	6,33755	106356	0,027802	0,39605	0,005499	0,053798	10,0541
Controle	549		1115	238	6,47257	106579	0,028521	0,706081	0,010432	0,102061	13,7295
Controle	548		1092	238	6,37553	106579	0,024567	0,419347	0,005355	0,052394	14,0292
Controle	547		1071	238	6,28692	106579	0,033075	0,752675	0,011113	0,108717	34,724
Controle	545		1103	237	6,42194	106802	0,021811	0,772388	0,007908	0,077369	4,18299
Controle	543		877	223	5,46835	109977	0,013062	0,492823	0,002937	0,02873	4,83093
Controle	537	60	983	217	5,91561	111367	0,053328	0,478486	0,012905	0,126248	12,652
Controle	536		946	218	5,75949	111134	0,042902	0,514328	0,011661	0,114083	10,9701
Controle	535		958	218	5,81013	111134	0,043621	0,410387	0,003739	0,036584	13,6064
Controle	534		925	217	5,67089	111367	0,027683	1,93545	0,022435	0,219489	11,8496
Controle	532	118	897	216	5,55274	111600	0,021092	0,991022	0,008863	0,086707	13,4949
Controle	530		1115	211	6,47257	112774	0,024926	0,317199	0,003858	0,037741	9,44
Controle	528		1092	210	6,37553	113010	0,027203	0,775972	0,009519	0,09313	7,68606

Controle	527		1070	211	6,2827	112774	0,023129	0,942636	0,008381	0,081996	15,0146
Controle	525		1047	210	6,18565	113010	0,054287	1,13797	0,020472	0,200286	38,878
Controle	524		1028	209	6,10549	113247	0,018455	0,492823	0,004364	0,042691	11,197
Controle	523		984	204	5,91983	114438	0,048774	0,313615	0,00951	0,093037	6,19419
Controle	522		960	202	5,81857	114918	0,039547	0,30107	0,001566	0,015319	4,86423
Controle	521	126	1102	195	6,41772	116614	0,016538	0,535833	0,004026	0,039391	4,33583
Controle	518		987	183	5,93249	119579	0,056683	0,856616	0,024017	0,234966	14,8957
Controle	517	127	1070	184	6,2827	119329	0,023129	0,856616	0,010633	0,104028	8,40616
Controle	516		1047	183	6,18565	119579	0,039547	0,78314	0,013905	0,136033	24,8596
Controle	515		1029	182	6,1097	119830	0,039666	0,426516	0,007239	0,070818	21,6188
Controle	514	125	658	198	4,5443	115884	0,024447	3,67915	0,038629	0,377915	15,2565
Controle	512		1005	182	6,00844	119830	0,053568	0,331535	0,007492	0,073293	33,2343
Controle	511		1018	179	6,06329	120585	0,046857	0,446229	0,011095	0,108549	17,4851
Controle	505		1047	142	6,18565	130292	0,127028	0,682784	0,030686	0,300212	54,8903
Controle	504		1020	142	6,07173	130292	0,276706	0,69712	0,06336	0,619871	6,34415
Controle	503		1004	141	6,00422	130565	0,41452	0,47311	0,078252	0,765559	171,277

Controle	502		949	141	5,77215	130565	0,264722	1,38886	0,105775	1,03483	327,735
Controle	501		986	139	5,92827	131113	0,722743	1,49997	0,368471	3,60487	911,308
Controle	498		965	132	5,83966	133048	0,376052	1,05733	0,15888	1,55437	4,83441
Controle	496		972	130	5,8692	133606	0,400499	0,379922	0,056449	0,552253	7,31643
Controle	494		942	129	5,74262	133886	0,191142	0,179208	0,014451	0,141378	18,5713
Controle	491		951	128	5,78059	134166	0,23692	0,204297	0,028363	0,277487	153,329
Controle	490		1058	127	6,23207	134447	0,255135	0,401427	0,0347	0,339477	54,1079
Controle	489		1036	127	6,13924	134447	0,300074	0,234763	0,034816	0,34062	48,7776
Controle	488		1007	127	6,01688	134447	0,224217	0,265228	0,032201	0,315031	62,94
Controle	484	128	1067	127	6,27004	134447	0,217506	1,07525	0,068032	0,665578	98,8297
Controle	483		1047	128	6,18565	134166	0,282218	0,365585	0,055788	0,545786	290,609
Controle	482		1030	127	6,11392	134447	0,271313	0,198921	0,025047	0,24504	44,2015
Controle	481		1021	127	6,07595	134447	0,333509	0,367377	0,056465	0,55241	184,29
Controle	885	69	718	1289	4,35117	18173	0,016777	0,648734	0,003694	0,035649	18,252
Controle	884	0	808	1293	4,73001	18065	0,091676	7,52316	0,123572	1,1925	0
Controle	877		858	1258	4,94047	19027	0,067109	0,620061	0,003873	0,037373	5,21155

Controle	874		834	1257	4,83945	19056	0,028402	0,616477	0,004344	0,04192	6,42232
Controle	854		1721	1160	8,57306	21748	0,188625	0,263436	0,009232	0,089088	20,5064
Controle	853		1708	1160	8,51834	21748	0,173286	0,259852	0,008748	0,084421	17,8797
Controle	852	55	549	1166	3,63981	21580	0,069386	5,1146	0,134718	1,30006	0
Controle	832		1646	1099	8,25737	23531	0,008748	1,09138	0,004159	0,040134	5,15532
Controle	804	53	826	961	4,80577	28123	0,057762	9,21131	0,215111	2,07588	0
Controle	793	4	702	909	4,28382	30106	0,03703	5,64506	0,07322	0,706591	46,4248
Controle	792		965	900	5,39086	30590	0,033315	1,02507	0,005131	0,04952	4,93463
Controle	788		335	893	2,73903	30972	0,016418	5,37983	0,04095	0,395179	7,20042
Controle	783		1329	872	6,92303	32145	0,010666	0,383506	0,002107	0,020329	4,37247
Controle	781	63	1485	878	7,57968	31805	0,083527	18,1287	0,24844	2,39751	0
Controle	778	5	940	853	5,28563	33245	0,0151	2,28311	0,016888	0,162972	9,41478
Controle	776	68	761	844	4,53217	33779	0,027323	3,1236	0,038253	0,369152	0
Controle	730	11	844	759	4,88154	39265	0,008868	0,370961	0,001462	0,014108	9,29006
Controle	725		1137	718	6,11485	42221	0,019653	0,707873	0,003896	0,037593	4,18709
Controle	723	91	1160	717	6,21167	42296	0,011864	0,808229	0,004791	0,046237	5,24535

Controle	722		379	705	2,92423	43204	0,025645	0,974893	0,00913	0,088104	9,18413
Controle	721	12	546	702	3,62718	43434	0,042423	3,24188	0,035258	0,340248	0
Controle	719		1829	697	9,02766	43821	0,009587	0,672031	0,002413	0,023282	4,96423
Controle	718	92	970	694	5,41191	44054	0,013182	1,50893	0,007865	0,075901	7,1555
Controle	715		1255	679	6,61155	45326	0,026125	0,297486	0,002057	0,019848	4,60416
Controle	714	93	410	678	3,05472	45436	0,008628	0,370961	0,00109	0,010516	6,37556
Controle	712	95	887	669	5,06254	46431	0,020373	0,510744	0,002361	0,022781	5,23977
Controle	707	13	1003	664	5,55081	46994	0,019773	1,98921	0,013595	0,131191	10,4579
Controle	705	16	1224	657	6,48106	47793	0,019893	1,05554	0,005415	0,052252	20,2291
Controle	704	73	337	663	2,74744	47107	0,023129	3,215	0,024981	0,24107	5,79302
Controle	703	94	967	660	5,39928	47449	0,018455	1,94441	0,015644	0,150973	27,9966
Controle	700	15	1474	631	7,53337	50882	0,021092	0,369169	0,001397	0,013486	4,47936
Controle	699	97	1309	628	6,83885	51251	0,026245	0,991022	0,004474	0,043172	9,16152
Controle	698	77	337	631	2,74744	50882	0,020253	2,86733	0,029932	0,288851	16,7619
Controle	697		1578	633	7,97114	50637	0,021451	3,75979	0,030442	0,293774	23,0702
Controle	692		1789	623	8,85929	51872	0,028402	3,75083	0,026188	0,252722	7,96967

Controle	691		693	622	4,24594	51997	0,023968	1,93007	0,020431	0,197164	10,7328
Controle	689	19	1061	608	5,79495	53780	0,142008	6,95866	0,299669	2,89189	0
Controle	688	98	1018	609	5,61395	53651	0,164418	1,88706	0,152692	1,47352	32,5033
Controle	687	17	1418	606	7,29765	54040	0,024926	2,79027	0,019539	0,188559	10,0529
Controle	686	67	1493	604	7,61335	54301	0,02217	2,92289	0,019997	0,192974	18,2139
Controle	684	81	1594	601	8,03848	54695	0,022889	2,10391	0,017262	0,166585	26,5682
Controle	683	20	334	601	2,73482	54695	0,076577	2,34942	0,062775	0,605798	149,147
Controle	681		1033	591	5,67709	56028	0,065671	0,2491	0,00627	0,060508	5,34599
Controle	680	74	389	594	2,96633	55625	0,039427	1,51431	0,030344	0,292831	8,60515
Controle	679		1789	593	8,85929	55759	0,015219	2,25982	0,016622	0,160409	7,67739
Controle	677	62	428	590	3,13049	56164	0,048415	2,89421	0,059267	0,571943	25,0886
Controle	676		1175	582	6,2748	57256	0,012463	0,756259	0,004959	0,047858	4,23085
Controle	675	58	975	588	5,43295	56435	0,88033	4,73647	1,56754	15,1272	0
Controle	673		1380	576	7,1377	58090	0,02205	1,55553	0,010473	0,101063	33,208
Controle	672	21	903	585	5,12989	56844	0,816217	3,51607	1,2296	11,866	0
Controle	671	83	692	572	4,24173	58652	0,022649	1,46592	0,020006	0,193063	10,7477

Controle	670	22	654	573	4,08178	58511	0,184431	7,27765	0,495177	4,7786	0
Controle	667	54	938	588	5,27721	56435	0,906934	2,96769	1,44719	13,9658	0
Controle	666	100	1450	571	7,43235	58794	0,020732	3,20424	0,019143	0,184734	4,89285
Controle	665	96	1736	565	8,6362	59650	0,010785	1,05195	0,004441	0,042861	4,74706
Controle	664	99	1509	568	7,6807	59220	0,017257	2,11824	0,013417	0,129475	8,04911
Controle	662	25	1118	551	6,03488	61695	0,011864	0,709665	0,003784	0,036515	17,359
Controle	661		692	552	4,24173	61547	0,024327	0,99819	0,013953	0,134648	5,30387
Controle	658	24	1157	544	6,19904	62744	0,015339	1,47847	0,01096	0,105768	7,13595
Controle	657	75	1186	542	6,32111	63047	0,020253	2,67737	0,024782	0,239153	4,77496
Controle	656	79	1285	539	6,73782	63505	0,023848	3,06805	0,031232	0,301398	9,71957
Controle	655		1758	531	8,7288	64740	0,026245	0,781348	0,003633	0,03506	4,05906
Controle	653	23	1234	537	6,52315	63811	0,02217	3,758	0,037706	0,363874	6,55494
Controle	652		697	529	4,26278	65053	0,03679	0,397842	0,00407	0,039278	4,10336
Controle	650		689	530	4,2291	64896	0,024327	1,53761	0,020048	0,193471	7,06608
Controle	641	65	856	515	4,93205	67114	0,02229	3,33686	0,032892	0,317419	12,383
Controle	636	61	824	487	4,79735	71164	0,104499	3,29206	0,096339	0,929701	0

Controle	633	102	647	479	4,05232	72366	0,020852	2,19172	0,019145	0,184758	5,78325
Controle	631	26	689	480	4,2291	72214	0,026604	1,61825	0,019351	0,18674	10,7983
Controle	630	82	1154	472	6,18641	73434	0,026005	2,672	0,023756	0,229251	0
Controle	629	28	1105	476	5,98016	72822	0,041464	2,2401	0,033891	0,327058	60,8511
Controle	628		687	471	4,22069	73587	0,019893	0,426516	0,005142	0,049622	9,87625
Controle	627	64	911	477	5,16356	72669	0,038348	4,11821	0,058893	0,568329	28,7105
Controle	626	27	1065	474	5,81179	73127	0,060638	2,31358	0,043156	0,416471	39,1158
Controle	624	101	969	470	5,4077	73742	0,012943	0,566298	0,003374	0,032561	4,33146
Controle	622	57	1016	470	5,60553	73742	0,044939	4,50709	0,092165	0,889422	0
Controle	619		883	472	5,0457	73434	0,038109	2,63436	0,043942	0,42405	22,4834
Controle	615	103	690	455	4,23331	76093	0,02996	1,89065	0,022957	0,221545	7,86993
Controle	613	104	1307	446	6,83043	77540	0,039187	0,616477	0,003859	0,037245	10,3533
Controle	612		1418	445	7,29765	77702	0,018096	1,52685	0,012244	0,118155	6,34019
Controle	610		1389	444	7,17559	77865	0,017736	0,749091	0,007086	0,068382	8,00196
Controle	609		1372	445	7,10403	77702	0,019174	3,06984	0,022254	0,21476	6,95773
Controle	606	106	913	440	5,17198	78520	0,025885	1,61287	0,016752	0,161656	5,66433

Controle	604	105	1035	439	5,68551	78684	0,02241	1,4946	0,014657	0,141439	4,70845
Controle	600	107	998	436	5,52977	79180	0,022889	2,45336	0,026707	0,257733	8,71121
Controle	599		689	431	4,2291	80012	0,025765	0,727586	0,008714	0,084089	5,57211
Controle	598		969	433	5,4077	79678	0,022889	1,99638	0,020811	0,200833	13,2593
Controle	597	33	941	437	5,28984	79014	0,024447	2,03939	0,026	0,250906	16,2404
Controle	593	108	691	414	4,23752	82910	0,023968	1,18277	0,013771	0,132896	4,29225
Controle	587		1374	396	7,11245	86093	0,023488	1,1326	0,005847	0,05643	6,76625
Controle	585		690	392	4,23331	86817	0,02217	0,670239	0,007008	0,067634	10,6174
Controle	582	76	994	393	5,51293	86635	0,119838	2,07882	0,071643	0,691371	32,5177
Controle	581	70	971	392	5,41612	86817	0,148839	1,99459	0,105181	1,01503	150,866
Controle	580	37	942	391	5,29405	86998	0,110371	1,34585	0,056378	0,544064	48,2262
Controle	576	66	912	387	5,16777	87730	0,059799	1,84047	0,040404	0,38991	50,0893
Controle	575		690	382	4,23331	88653	0,019653	0,517912	0,005444	0,052531	5,50959
Controle	573	38	885	382	5,05412	88653	0,045778	1,28492	0,023448	0,226283	15,1649
Controle	571		1437	371	7,37763	90717	0,012823	0,326159	0,001344	0,012966	6,60205
Controle	570		1422	368	7,31449	91288	0,011504	0,526872	0,002225	0,021475	4,07859

Controle	569		689	372	4,2291	90527	0,021211	0,926507	0,01057	0,102004	5,10763
Controle	565		509	357	3,47144	93414	0,006951	0,399634	0,00133	0,012837	4,63109
Controle	564	109	886	355	5,05833	93806	0,016777	0,451605	0,003909	0,037719	9,05049
Controle	563	40	971	355	5,41612	93806	0,034274	0,987438	0,015044	0,145174	10,1198
Controle	562		690	356	4,23331	93610	0,020253	0,732962	0,006925	0,066828	11,6235
Controle	560		646	344	4,04811	95990	0,016658	0,973101	0,007911	0,07634	6,90914
Controle	557	72	940	343	5,28563	96191	0,067828	1,33152	0,041977	0,405087	80,1095
Controle	556		690	343	4,23331	96191	0,017377	0,870952	0,00787	0,075944	8,60251
Controle	553	59	911	341	5,16356	96595	0,047935	1,16127	0,026135	0,252214	87,3002
Controle	550		885	338	5,05412	97203	0,030199	1,01253	0,015896	0,153404	5,21539
Controle	549	56	802	339	4,70475	97000	0,05189	2,43544	0,029808	0,287654	30,8998
Controle	541		930	320	5,24354	100935	0,459459	0,659487	0,112039	1,0812	17,4528
Controle	539		952	324	5,33614	100093	0,75426	1,22578	0,52192	5,03668	363,262
Controle	538		978	324	5,44558	100093	0,845457	1,73294	0,749088	7,22891	764,022
Controle	537		886	318	5,05833	101358	0,056564	0,634397	0,013178	0,127174	57,4593
Controle	536		867	316	4,97835	101783	0,03703	0,501783	0,008133	0,078485	26,1494

Controle	533		657	315	4,09441	101996	0,017976	0,381714	0,003298	0,031827	6,88619
Controle	532		539	316	3,59771	101783	0,021451	1,58779	0,012223	0,117958	9,64337
Controle	530	44	843	315	4,87733	101996	0,029001	0,480278	0,006858	0,066183	5,85109
Controle	529		828	314	4,81419	102210	0,028282	0,474902	0,005848	0,056436	30,4409
Controle	528	112	801	314	4,70054	102210	0,028881	0,369169	0,004333	0,041813	56,4078
Controle	527		719	314	4,35538	102210	0,018335	0,322575	0,002792	0,026942	32,9656
Controle	526	114	690	315	4,23331	101996	0,023488	1,23475	0,011556	0,111517	32,3175
Controle	525	110	644	315	4,03969	101996	0,027323	0,99819	0,009247	0,089239	69,3348
Controle	524		583	316	3,78292	101783	0,018575	0,835111	0,005281	0,050965	27,9588
Controle	523		554	315	3,66085	101996	0,017017	0,924715	0,006842	0,06603	4,72143
Controle	522		783	313	4,62477	102424	0,019294	0,317199	0,002926	0,028236	19,3384
Controle	521		773	314	4,58268	102210	0,023608	0,435476	0,004547	0,043877	27,1077
Controle	520		748	314	4,47745	102210	0,024807	0,60214	0,004802	0,046341	44,0924
Controle	519	111	728	313	4,39327	102424	0,016058	0,256268	0,001991	0,01921	4,71072
Controle	518		612	314	3,90499	102210	0,018455	1,0179	0,008818	0,085094	11,7382
Controle	515		681	297	4,19543	105912	0,027922	1,78312	0,018563	0,179134	18,9331

Controle	514	113	646	297	4,04811	105912	0,030559	0,996398	0,008214	0,079271	7,66311
Controle	513		828	294	4,81419	106579	0,013901	0,397842	0,003124	0,030147	4,32432
Controle	509	47	965	293	5,39086	106802	0,132541	2,84045	0,171811	1,65803	110,76
Controle	508	115	909	285	5,15514	108605	0,079213	0,663071	0,02311	0,223021	11,1999
Controle	505		885	282	5,05412	109289	0,069626	1,49997	0,025988	0,250792	27,8377
Controle	501	48	935	276	5,26458	110670	0,227093	1,78312	0,140316	1,35409	281,841
Controle	500		644	274	4,03969	111134	0,012703	0,648734	0,003871	0,037359	4,48556
Controle	498		1085	274	5,89597	111134	0,0296	2,71501	0,032925	0,317738	12,4266
Controle	497		826	275	4,80577	110902	0,016538	0,747299	0,006552	0,063232	16,6729
Controle	496		801	274	4,70054	111134	0,009827	0,627229	0,00312	0,030105	7,26826
Controle	495		779	274	4,60794	111134	0,011864	0,684576	0,003684	0,035554	5,49509
Controle	491	117	970	265	5,41191	113247	0,098986	1,71682	0,072487	0,699516	62,6787
Controle	489		1005	259	5,55923	114678	0,094313	1,87452	0,057373	0,553668	34,0473
Controle	488		827	254	4,80998	115884	0,017137	0,340496	0,00351	0,033873	5,33361
Controle	487	116	688	254	4,2249	115884	0,018215	1,43367	0,010423	0,10058	6,93767
Controle	486		1057	252	5,77811	116370	0,042543	0,956972	0,012733	0,122874	5,86167

Controle	483		775	246	4,5911	117840	0,011864	0,761635	0,003909	0,037726	5,28915
Controle	482		828	246	4,81419	117840	0,018575	0,94622	0,009165	0,088442	4,35514
Controle	480		885	246	5,05412	117840	0,023728	0,750883	0,008474	0,081776	20,1908
Controle	479	125	644	246	4,03969	117840	0,016058	1,44442	0,009192	0,088703	4,01559
Controle	478		941	243	5,28984	118583	0,054646	0,948012	0,028105	0,271217	73,4791
Controle	477		911	245	5,16356	118087	0,031877	1,01432	0,016377	0,15804	67,3888
Controle	475	60	968	241	5,40349	119080	0,043381	1,09855	0,024806	0,239387	41,0342
Controle	473		829	229	4,8184	122108	0,018455	1,47668	0,010533	0,101647	13,2288
Controle	472	119	801	229	4,70054	122108	0,013062	0,419347	0,002113	0,020389	4,45548
Controle	471		943	227	5,29826	122620	0,049853	0,806437	0,01913	0,184607	44,8457
Controle	470		912	225	5,16777	123135	0,028881	0,976685	0,011128	0,107386	20,2178
Controle	469	118	885	222	5,05412	123910	0,025885	1,40141	0,013205	0,127429	5,40217
Controle	468		781	229	4,61636	122108	0,011265	0,756259	0,003992	0,038524	5,88041
Controle	467		969	226	5,4077	122877	0,054167	1,4498	0,040439	0,39025	26,622
Controle	466		1107	223	5,98857	123651	0,034274	0,374545	0,002706	0,026109	8,79479
Controle	465		1093	223	5,92965	123651	0,016897	0,489239	0,002959	0,028559	5,61451

Controle	462		967	208	5,39928	127594	0,046737	2,18276	0,044512	0,429551	16,5591
Controle	460		975	192	5,43295	131939	0,034034	1,42829	0,021156	0,204163	11,7863
Controle	458		770	181	4,57005	135011	0,011145	0,6111	0,002544	0,024553	6,99705
Controle	457		829	180	4,8184	135294	0,012703	0,526872	0,003166	0,030553	4,33121
Controle	454		914	171	5,17619	137866	0,0151	0,887081	0,006186	0,059692	6,17243
Controle	450	80	886	162	5,05833	140487	0,018335	0,888873	0,009114	0,087948	5,30313
Exposto	7374		1278	1334	6,50222	16543	0,012583	0,664863	0,002866	0,027146	5,00231
Exposto	7369		1269	1310	6,46227	17081	0,023129	0,517912	0,00364	0,03448	14,8086
Exposto	7362		815	1293	4,44705	17473	0,011624	1,22399	0,00624	0,059114	4,63722
Exposto	7361		1264	1289	6,44008	17566	0,022889	0,313615	0,001272	0,012048	6,64394
Exposto	7357	0	850	1265	4,60241	18138	0,05944	0,532249	0,007601	0,072006	9,51351
Exposto	7354		1319	1262	6,68421	18211	0,017736	1,00536	0,004997	0,047335	13,1234
Exposto	7353		1245	1262	6,35574	18211	0,02948	1,42471	0,014632	0,138603	6,63358
Exposto	7350	84	1245	1250	6,35574	18504	0,032117	1,44083	0,0152	0,143982	4,0724
Exposto	7348		1052	1247	5,49905	18579	0,009108	1,25446	0,004945	0,046839	4,83319
Exposto	7345		1228	1252	6,28028	18455	0,024447	1,21862	0,009863	0,09343	18,6686

Exposto	7341		1173	1215	6,03614	19389	0,023129	0,793893	0,005274	0,049958	17,8974
Exposto	7340	69	817	1211	4,45593	19493	0,01474	0,569882	0,00374	0,03543	4,23433
Exposto	7330		1478	1183	7,38998	20232	0,02241	0,489239	0,002607	0,024695	5,9594
Exposto	7321	86	1459	1149	7,30564	21149	0,047576	3,7132	0,060277	0,570991	27,9355
Exposto	7317	55	532	1100	3,19087	22545	0,138533	4,37089	0,109102	1,03349	81,7733
Exposto	7316	1	1375	1074	6,93278	23323	0,009947	0,564506	0,002383	0,022573	4,37272
Exposto	7314		341	1007	2,34306	25453	0,053687	0,225802	0,003631	0,034399	65,0432
Exposto	7311	2	873	982	4,7045	26297	0,028282	0,593179	0,002688	0,02546	4,8631
Exposto	7309	87	441	974	2,78694	26573	0,056204	0,193545	0,00313	0,029647	56,2232
Exposto	7308	3	1119	935	5,79645	27959	0,007909	0,512536	0,001948	0,018456	5,0374
Exposto	7306	53	851	879	4,60685	30123	0,107974	10,2256	0,355916	3,37149	87,0976
Exposto	7299	4	729	836	4,06531	32896	0,033435	7,16654	0,08384	0,794188	0
Exposto	7292	63	1408	828	7,07926	33439	0,114445	21,9656	0,530085	5,02135	0
Exposto	7291	6	1026	814	5,38364	34412	0,010186	0,571674	0,003037	0,028768	6,70365
Exposto	7290		936	813	4,98415	34482	0,0151	0,648734	0,003412	0,032322	5,0798
Exposto	7289	5	975	815	5,15726	34341	0,024926	2,80103	0,025473	0,241297	10,0933

Exposto	7286		977	800	5,16614	35413	0,032476	2,88705	0,028833	0,273131	4,11317
Exposto	7284	7	1609	785	7,97146	36517	0,015219	0,413971	0,002418	0,022901	5,46141
Exposto	7283		1329	784	6,7286	36592	0,0151	0,351248	0,001847	0,017496	6,15787
Exposto	7277	8	1032	759	5,41027	38514	0,019054	2,11466	0,019709	0,186695	5,15867
Exposto	7276	68	786	753	4,31833	38990	0,063874	7,32783	0,146519	1,38794	44,3757
Exposto	7275		910	738	4,86874	40207	0,028881	3,17378	0,025821	0,244599	18,4502
Exposto	7273	9	1291	692	6,55992	44178	0,011624	0,311822	0,001702	0,016118	5,87102
Exposto	7271	71	961	692	5,09512	44178	0,027922	5,10744	0,058588	0,554991	17,9056
Exposto	7270		905	689	4,84654	44450	0,024087	2,39243	0,027087	0,256585	11,613
Exposto	7269	11	879	688	4,73113	44542	0,02984	2,49996	0,03547	0,335992	7,11312
Exposto	7268		934	690	4,97527	44360	0,020852	2,41214	0,025377	0,240392	7,03323
Exposto	7267	10	1333	676	6,74635	45724	0,010066	0,496407	0,002288	0,021678	5,82798
Exposto	7264	14	1380	656	6,95498	47857	0,011385	0,596764	0,002502	0,0237	6,68097
Exposto	7263	12	545	661	3,24857	47314	0,033315	3,10389	0,024847	0,235369	17,5989
Exposto	7258	13	1046	641	5,47242	49522	0,022649	1,57703	0,012818	0,121416	5,35379
Exposto	7256	88	1789	626	8,77045	51244	0,015699	0,835111	0,004828	0,045732	4,36528

Exposto	7255	89	1757	621	8,62841	51832	0,020013	2,51967	0,024093	0,228226	12,646
Exposto	7254		1714	618	8,43754	52188	0,023608	1,1093	0,010749	0,101817	6,10525
Exposto	7253	73	371	619	2,47622	52069	0,023728	6,78483	0,05977	0,566186	23,5862
Exposto	7252	90	1594	608	7,90488	53391	0,048774	8,24	0,110214	1,04402	0
Exposto	7250		1790	602	8,77489	54126	0,025166	0,657694	0,003244	0,030733	4,37371
Exposto	7249		1482	607	7,40774	53513	0,041344	4,15584	0,062538	0,592409	48,165
Exposto	7248	15	1408	602	7,07926	54126	0,02984	3,49815	0,045191	0,428081	15,2131
Exposto	7247		1317	596	6,67533	54872	0,011624	0,797477	0,004244	0,040203	4,91631
Exposto	7246	77	370	596	2,47178	54872	0,017976	1,6523	0,017565	0,166386	7,38704
Exposto	7244	81	1499	587	7,4832	56009	0,02984	3,43005	0,044567	0,422165	10,3921
Exposto	7243	67	1430	583	7,17692	56522	0,032836	2,3548	0,032656	0,309338	20,189
Exposto	7242	17	1367	579	6,89727	57040	0,025765	2,21322	0,024764	0,234586	9,6695
Exposto	7241		1335	575	6,75523	57563	0,020972	1,67381	0,017585	0,166581	5,35118
Exposto	7239		1306	571	6,62651	58090	0,032596	2,67916	0,026042	0,24669	10,8429
Exposto	7238	18	1201	568	6,16043	58488	0,02984	2,24369	0,036159	0,342521	10,3151
Exposto	7236	16	1249	565	6,37349	58890	0,023728	3,81893	0,047558	0,450502	8,41959

Exposto	7235	20	373	554	2,4851	60385	0,065432	2,88525	0,067766	0,641929	128,506
Exposto	7232	58	1024	546	5,37476	61497	0,721305	4,82249	1,18613	11,2359	0
Exposto	7231	62	416	544	2,67597	61778	0,048654	3,34403	0,067391	0,638371	40,0441
Exposto	7230	19	1104	546	5,72987	61497	0,182393	5,80993	0,258412	2,44786	0
Exposto	7228		1195	538	6,1338	62629	0,020253	1,84585	0,018673	0,176885	19,9486
Exposto	7226	21	906	541	4,85098	62202	0,649522	4,09312	0,89009	8,43156	0
Exposto	7225	54	964	548	5,10843	61217	0,881169	5,79022	2,66921	25,2847	0
Exposto	7213	79	1297	509	6,58656	66839	0,047336	4,65942	0,073488	0,696128	0
Exposto	7211	23	1234	502	6,30691	67830	0,045059	2,37989	0,039417	0,373386	42,5956
Exposto	7210	24	1155	500	5,95625	68116	0,025286	1,49101	0,01743	0,165106	15,1072
Exposto	7209	75	1195	500	6,1338	68116	0,043142	2,30103	0,038565	0,365313	66,651
Exposto	7208	25	1125	499	5,82308	68260	0,02241	2,06448	0,01939	0,183676	11,9182
Exposto	7207	22	678	515	3,83893	66000	0,18491	9,74176	0,388684	3,68189	0
Exposto	7205	65	880	485	4,73557	70300	0,044819	1,75983	0,045708	0,432978	0
Exposto	7204		1124	473	5,81864	72098	0,017496	1,11826	0,010373	0,098255	4,06199
Exposto	7201	61	880	462	4,73557	73786	0,08916	3,08059	0,105128	0,99585	0

Exposto	7199	82	1311	449	6,6487	75833	0,142008	1,56449	0,010793	0,102243	4,46754
Exposto	7198	57	1045	447	5,46798	76152	0,082089	2,90497	0,088559	0,838891	43,4954
Exposto	7197	26	718	448	4,01649	75992	0,013901	2,34046	0,014185	0,134373	8,18289
Exposto	7196	29	1249	445	6,37349	76473	0,023848	0,944428	0,008962	0,084892	4,34104
Exposto	7195		1231	446	6,2936	76313	0,025765	0,851239	0,01045	0,098992	11,3631
Exposto	7194		1146	446	5,9163	76313	0,072502	1,2903	0,039809	0,377094	49,5138
Exposto	7193	28	1110	446	5,7565	76313	0,082808	1,16306	0,044398	0,420567	29,0028
Exposto	7192	27	1079	447	5,6189	76152	0,091796	1,17561	0,050389	0,477319	50,6692
Exposto	7191	30	1192	445	6,12048	76473	0,053687	1,63796	0,033161	0,314127	46,9291
Exposto	7190		974	445	5,15282	76473	0,026844	0,879913	0,01098	0,104006	22,8617
Exposto	7188	64	940	443	5,0019	76796	0,03739	3,60029	0,066971	0,634398	0
Exposto	7187		904	439	4,84211	77445	0,055964	1,39245	0,028262	0,267721	20,0129
Exposto	7186		879	439	4,73113	77445	0,072382	1,4265	0,028731	0,272162	21,4838
Exposto	7183		1039	424	5,44134	79928	0,057642	2,18455	0,070668	0,669419	6,93473
Exposto	7180	32	1128	402	5,8364	83715	0,02205	2,44978	0,024307	0,230256	9,00883
Exposto	7179		1002	400	5,27711	84068	0,072862	1,03403	0,016843	0,159549	10,8561

Exposto	7178	31	1035	399	5,42359	84245	0,079812	1,42291	0,015343	0,145343	18,8365
Exposto	7177		1009	399	5,30818	84245	0,050931	0,428308	0,004313	0,040854	4,41783
Exposto	7176	33	974	399	5,15282	84245	0,02936	0,899626	0,014268	0,135158	13,7085
Exposto	7175		957	399	5,07736	84245	0,031637	0,992814	0,016895	0,160043	13,8314
Exposto	7174		934	398	4,97527	84423	0,035232	1,98204	0,0316	0,299335	5,12509
Exposto	7173	34	880	390	4,73557	85856	0,036431	2,28311	0,039241	0,371717	5,07452
Exposto	7171	78	717	379	4,01205	87866	0,012104	0,82615	0,004697	0,044493	6,14803
Exposto	7169		1037	377	5,43247	88237	0,05908	2,11466	0,068887	0,652542	9,88799
Exposto	7161	35	1247	372	6,36462	89170	0,015219	0,958764	0,007071	0,066977	4,63549
Exposto	7160		1235	371	6,31135	89358	0,011864	0,636189	0,003831	0,036293	4,1608
Exposto	7159		778	369	4,28282	89735	0,021331	2,14333	0,017393	0,164762	4,0694
Exposto	7158		1198	369	6,14711	89735	0,023848	2,2867	0,023018	0,218044	25,5277
Exposto	7157		1170	369	6,02283	89735	0,023728	1,23654	0,013383	0,126769	4,6876
Exposto	7155	66	937	365	4,98859	90493	0,043861	1,67381	0,029814	0,282424	19,8636
Exposto	7154	38	881	360	4,74001	91450	0,03703	1,37274	0,028577	0,270698	6,6364
Exposto	7153	36	1131	365	5,84971	90493	0,061117	2,84941	0,040472	0,38338	25,6127

Exposto	7152	76	1041	358	5,45022	91836	0,106895	2,61823	0,114655	1,08609	11,5371
Exposto	7151		1023	358	5,37032	91836	0,055365	0,663071	0,018953	0,179534	32,0877
Exposto	7150		972	357	5,14394	92029	0,046377	0,758051	0,014877	0,140928	4,22714
Exposto	7149	70	1006	358	5,29486	91836	0,063754	0,983854	0,028678	0,271658	33,704
Exposto	7148		987	357	5,21053	92029	0,058002	0,745506	0,019105	0,180972	7,31174
Exposto	7147	37	959	361	5,08624	91258	0,048534	1,88169	0,036912	0,349659	22,2388
Exposto	7144		1128	339	5,8364	95582	0,013062	0,582427	0,004676	0,044294	4,32118
Exposto	7142	39	1027	328	5,38808	97820	0,073581	2,77773	0,1254	1,18788	5,44364
Exposto	7141		879	325	4,73113	98439	0,053568	1,65588	0,036407	0,344876	33,5731
Exposto	7139	56	832	324	4,52251	98647	0,034633	1,32435	0,018614	0,176324	0
Exposto	7138		673	325	3,81674	98439	0,02217	4,51784	0,04283	0,405718	14,23
Exposto	7136		1263	321	6,43564	99271	0,010666	0,38709	0,002054	0,019453	4,20185
Exposto	7135		1249	320	6,37349	99480	0,012703	0,580635	0,003426	0,032452	5,83558
Exposto	7133		1201	318	6,16043	99900	0,019294	1,80463	0,014661	0,138875	20,4435
Exposto	7132		1129	318	5,84084	99900	0,015819	1,06271	0,009384	0,088889	6,02251
Exposto	7127		1390	311	6,99937	101382	0,021092	1,96771	0,014565	0,137974	5,21893

Exposto	7124		1329	308	6,7286	102024	0,010426	0,833319	0,004186	0,03965	4,4546
Exposto	7123	40	1008	310	5,30374	101596	0,029121	0,759843	0,009865	0,09345	4,88548
Exposto	7122	41	1030	306	5,40139	102454	0,076097	1,64692	0,070398	0,666862	37,2363
Exposto	7121		986	309	5,20609	101810	0,038588	0,761635	0,015671	0,148443	37,324
Exposto	7120	72	958	308	5,0818	102024	0,059679	1,6075	0,043119	0,408456	156,12
Exposto	7119		879	305	4,73113	102670	0,035232	0,734754	0,014263	0,135108	6,11787
Exposto	7118	59	937	307	4,98859	102239	0,047935	1,18098	0,023693	0,224432	43,0363
Exposto	7115		878	295	4,7267	104853	0,047576	0,926507	0,020192	0,191276	8,86692
Exposto	7112		1204	287	6,17375	106633	0,031517	0,905002	0,005482	0,051929	4,48776
Exposto	7111		959	284	5,08624	107309	0,036191	0,403219	0,008106	0,076789	15,7113
Exposto	7110	42	1032	285	5,41027	107083	0,107495	2,19709	0,121183	1,14793	27,3862
Exposto	7109	43	1006	283	5,29486	107535	0,062316	0,372753	0,013413	0,127056	5,22753
Exposto	7107		1130	285	5,84528	107083	0,020373	1,74728	0,019352	0,18332	10,1706
Exposto	7101		937	275	4,98859	109360	0,017017	0,614684	0,006053	0,057338	14,7121
Exposto	7097		958	273	5,0818	109821	0,035592	0,338704	0,007129	0,067533	6,64682
Exposto	7096	44	877	275	4,72226	109360	0,042063	0,842279	0,020264	0,191954	17,4771

Exposto	7092	47	1001	271	5,27267	110284	0,099705	1,99817	0,079917	0,757033	60,8293
Exposto	7091	46	1022	268	5,36588	110983	0,097189	1,18994	0,050403	0,477455	67,3037
Exposto	7090		958	261	5,0818	112630	0,043262	0,401427	0,008518	0,080693	19,7657
Exposto	7089		936	260	4,98415	112867	0,02948	0,485654	0,005798	0,054924	15,1199
Exposto	7088	85	712	262	3,98985	112393	0,014021	2,05731	0,012396	0,117425	11,674
Exposto	7086		670	260	3,80342	112867	0,01498	0,90321	0,005349	0,050666	5,19775
Exposto	7085	45	877	258	4,72226	113343	0,037869	0,65411	0,014188	0,134394	11,3223
Exposto	7083		1134	252	5,86303	114783	0,017976	0,34408	0,003357	0,031799	4,21081
Exposto	7082		1125	252	5,82308	114783	0,010306	0,304654	0,001409	0,013352	5,01711
Exposto	7081		958	246	5,0818	116241	0,050092	0,48207	0,012531	0,118703	36,0358
Exposto	7080	48	973	245	5,14838	116486	0,040385	0,856616	0,0152	0,143982	29,3728
Exposto	7077	60	998	238	5,25935	118214	0,078973	0,405011	0,00784	0,074268	18,2095
Exposto	7076	49	1016	237	5,33925	118463	0,051051	0,541209	0,013228	0,125306	36,8229
Exposto	7075	50	1035	236	5,42359	118713	0,039906	0,365585	0,007298	0,069129	13,2005
Exposto	7074		1167	235	6,00951	118963	0,016777	0,964141	0,007935	0,075161	5,93981
Exposto	7073		716	237	4,00761	118463	0,022769	2,1057	0,012752	0,120798	4,80385

Exposto	7072		1203	236	6,16931	118713	0,015579	1,27059	0,009455	0,089567	4,67499
Exposto	7071	51	1049	234	5,48573	119213	0,067349	1,26163	0,035221	0,333642	20,8501
Exposto	7070		970	232	5,13507	119716	0,020732	0,274189	0,003394	0,032149	8,41195
Exposto	7069		956	232	5,07292	119716	0,054646	0,455189	0,011349	0,107508	38,1931
Exposto	7068		933	236	4,97083	118713	0,035832	1,51431	0,029907	0,283296	31,8459
Exposto	7066		1127	233	5,83196	119465	0,017257	0,991022	0,008905	0,084355	6,5945
Exposto	7065	80	874	224	4,70894	121748	0,050452	3,83864	0,069393	0,657339	14,7079
Exposto	7064		1095	227	5,68992	120982	0,042782	1,39782	0,028731	0,27216	11,1001
Exposto	7063		1040	223	5,44578	122005	0,037869	0,749091	0,012094	0,114559	6,07479
Exposto	7062		1017	222	5,34369	122262	0,046497	0,960556	0,015892	0,150536	4,96193
Exposto	7060		984	222	5,19721	122262	0,018695	0,324367	0,003002	0,028436	4,05498
Exposto	7059		955	221	5,06848	122519	0,040985	0,277773	0,006411	0,060732	4,79151
Exposto	7058		955	212	5,06848	124862	0,057642	1,03224	0,022292	0,211168	15,9093
Exposto	7057		931	211	4,96195	125125	0,052489	1,55553	0,030393	0,2879	4,56055
Exposto	7055		1198	209	6,14711	125652	0,010546	0,367377	0,001877	0,01778	4,8017
Exposto	7054		1167	208	6,00951	125917	0,017736	0,948012	0,007471	0,070771	8,48731

Exposto	7053	52	1051	209	5,49461	125652	0,045419	1,23833	0,026454	0,250594	4,43432
Exposto	7051		1126	208	5,82752	125917	0,012943	0,413971	0,00265	0,025106	5,44396
Exposto	7048		1169	178	6,01839	134122	0,011744	0,437268	0,002358	0,022335	5,23454
Exposto	7047		954	178	5,06405	134122	0,025526	0,385298	0,006189	0,058624	5,53272
Exposto	9087		937	577	5,19495	56093	0,523812	2,70067	0,781467	8,38508	0
Exposto	9086	22	635	525	3,8612	64291	0,141649	7,53392	0,37195	3,99099	0
Exposto	9055		1372	1345	7,11609	16468	0,014141	1,1989	0,005765	0,06186	4,22725
Exposto	9051		1737	1301	8,72808	17459	0,060039	0,392466	0,0051	0,054726	65,7078
Exposto	9049		431	1295	2,96025	17599	0,018215	0,243723	0,001276	0,013693	15,4682
Exposto	9048		921	1283	5,12429	17882	0,035951	1,25446	0,015049	0,161478	7,62696
Exposto	9046	0	791	1256	4,55016	18535	0,02984	11,9908	0,127961	1,37301	5,1235
Exposto	9045		1822	1226	9,10347	19289	0,054526	0,216842	0,00311	0,033367	44,6268
Exposto	9043	86	1489	1191	7,63281	20201	0,017137	0,756259	0,003916	0,04202	5,29824
Exposto	9042		932	1190	5,17287	20226	0,040385	0,532249	0,00309	0,03316	4,19596
Exposto	9041		1843	1191	9,19621	20201	0,016418	0,634397	0,002701	0,028984	4,62799
Exposto	9039		1632	1167	8,26435	20815	0,018575	0,471318	0,002654	0,028475	4,10988

Exposto	9036		1610	1148	8,16719	21314	0,017496	0,905002	0,00552	0,059233	7,03684
Exposto	9035	55	494	1148	3,23849	21314	0,060279	5,14865	0,112848	1,21085	76,8626
Exposto	9033		382	1104	2,74385	22517	0,062675	0,275981	0,00395	0,042382	35,7213
Exposto	9023	87	426	915	2,93817	28504	0,064113	2,43006	0,011529	0,123708	5,73983
Exposto	9021	53	799	924	4,58549	28186	0,070944	13,2901	0,30041	3,22337	74,5662
Exposto	9020	7	1578	893	8,02587	29297	0,021811	0,489239	0,002593	0,027826	5,66613
Exposto	9019		970	901	5,34069	29006	0,016538	2,54476	0,01826	0,195928	5,08633
Exposto	9016	5	929	860	5,15962	30810	0,012104	2,03043	0,011117	0,119287	4,46199
Exposto	9015	4	667	869	4,00252	30287	0,031877	7,22926	0,076166	0,817255	0
Exposto	9014		429	855	2,95142	31105	0,011624	2,00355	0,010873	0,116665	5,70656
Exposto	9013		390	859	2,77918	30869	0,022889	4,22394	0,02752	0,295285	8,17115
Exposto	9011	63	1410	859	7,28391	30869	0,03727	14,4281	0,223893	2,40235	0
Exposto	9009		310	852	2,42587	31283	0,018934	5,96764	0,051626	0,553939	6,95353
Exposto	9008	6	968	843	5,33186	31824	0,014381	1,93366	0,012915	0,138572	4,62913
Exposto	9002		2219	804	10,8568	34276	1,81519	0,222218	0,190615	2,04528	69,8722
Exposto	8999		430	786	2,95584	35471	0,012943	2,0376	0,011458	0,12294	7,87675

Exposto	8998	68	733	785	4,29401	35539	0,033914	7,57155	0,103683	1,11251	27,8754
Exposto	8997	9	1136	769	6,07382	36638	0,041584	0,655902	0,003885	0,041681	5,26565
Exposto	8996		660	770	3,97161	36568	0,019893	2,63615	0,020896	0,224214	7,70723
Exposto	8993		1419	733	7,32366	39236	0,011624	1,47668	0,006598	0,070799	4,20608
Exposto	8989		546	723	3,46814	39990	0,012583	1,13976	0,006947	0,074544	6,25162
Exposto	8988	71	900	732	5,03155	39311	0,017496	5,03038	0,041524	0,445552	0
Exposto	8987		570	717	3,57413	40450	0,015579	1,73115	0,011094	0,119034	13,9547
Exposto	8986		1034	707	5,62334	41227	0,012463	1,16485	0,007875	0,084494	4,22409
Exposto	8985	12	510	692	3,30915	42421	0,016538	3,32611	0,023747	0,254806	4,9699
Exposto	8984	13	967	668	5,32745	44404	0,013182	0,655902	0,004079	0,043769	4,92992
Exposto	8979		1183	633	6,28139	48430	0,034513	1,16844	0,005431	0,058273	4,79012
Exposto	8978		311	637	2,43028	47924	0,045059	6,18985	0,065188	0,699459	23,9069
Exposto	8977	73	392	633	2,78801	48430	0,016897	3,01428	0,020228	0,21704	16,5489
Exposto	8976	88	1827	633	9,12555	48430	0,010785	1,58958	0,006856	0,073569	5,93352
Exposto	8975	89	1773	632	8,88707	48557	0,018455	4,4139	0,031046	0,33312	14,0061
Exposto	8974		432	628	2,96467	49069	0,011984	1,98384	0,009914	0,106381	13,8408

Exposto	8973	90	1565	626	7,96845	49327	0,038348	6,87801	0,104169	1,11772	0
Exposto	8972	15	1465	625	7,52681	49457	0,035113	4,19347	0,053661	0,575773	21,9842
Exposto	8968		2219	609	10,8568	51577	1,55382	0,202505	0,137505	1,47542	47,8144
Exposto	8965		1246	606	6,55962	51984	0,015339	1,99459	0,012306	0,132044	6,29855
Exposto	8962	81	1482	604	7,60189	52258	0,045179	2,8297	0,030469	0,326926	0
Exposto	8959	67	1415	605	7,30599	52121	0,020612	1,86197	0,018399	0,197414	12,2966
Exposto	8958		1359	604	7,05868	52258	0,016777	2,31358	0,018435	0,19781	6,73391
Exposto	8957		642	577	3,89211	56093	0,139731	2,76877	0,057429	0,616205	13,9552
Exposto	8956	20	313	578	2,43912	55946	0,060398	4,04652	0,086297	0,925959	108,78
Exposto	8955		1831	569	9,14322	57283	0,011864	0,836903	0,003874	0,041568	9,34489
Exposto	8954	74	360	573	2,64669	56685	0,039547	2,45695	0,045737	0,490749	20,9294
Exposto	8953	19	1036	573	5,63218	56685	0,158306	3,54653	0,187742	2,01446	172,059
Exposto	8952	58	976	574	5,36719	56536	0,515423	5,76334	1,22296	13,1222	0
Exposto	8951		725	566	4,25868	57735	0,060398	0,931883	0,026131	0,28038	6,13058
Exposto	8946	21	873	571	4,9123	56983	0,600628	4,68271	0,988928	10,6111	0
Exposto	8945	54	909	575	5,07129	56388	0,611174	2,63615	0,840731	9,02098	0

Exposto	8943		703	564	4,16151	58039	0,072262	1,50535	0,057875	0,620998	92,8277
Exposto	8942	62	412	567	2,87634	57584	0,033555	3,55012	0,048887	0,524549	0
Exposto	8940		822	561	4,68707	58498	0,160223	2,43544	0,139796	1,5	4,07007
Exposto	8939		741	562	4,32934	58344	0,058361	0,885289	0,027465	0,294692	9,07233
Exposto	8937		674	560	4,03344	58651	0,07382	1,70427	0,06142	0,659034	63,2366
Exposto	8936		468	560	3,12366	58651	0,021211	1,62363	0,014865	0,159503	8,8271
Exposto	8935		788	560	4,53691	58651	0,085085	1,77954	0,066089	0,709133	83,7544
Exposto	8934		755	559	4,39117	58805	0,061717	1,17202	0,037597	0,40341	58,0802
Exposto	8933		505	559	3,28707	58805	0,024087	3,93183	0,040174	0,431066	20,2797
Exposto	8931	79	1262	537	6,63028	62299	0,024807	3,43184	0,027699	0,297204	7,68531
Exposto	8930	75	1203	537	6,36972	62299	0,023129	2,63795	0,025694	0,275695	10,556
Exposto	8929		1115	534	5,98107	62791	0,018215	1,70069	0,015081	0,161816	5,42136
Exposto	8928	24	1161	535	6,18423	62627	0,031637	3,72036	0,042519	0,456225	11,0483
Exposto	8927	25	1039	528	5,64543	63787	0,023368	1,32435	0,011968	0,12841	5,57886
Exposto	8921	57	968	482	5,33186	70746	0,060279	2,88705	0,063678	0,683255	0
Exposto	8918	61	828	479	4,71356	71194	0,051171	3,85835	0,085072	0,912817	20,9354

Exposto	8917	26	698	479	4,13943	71194	0,01462	1,1093	0,007723	0,082869	8,62158
Exposto	8916	82	1151	477	6,14006	71494	0,030798	2,39781	0,024577	0,263703	11,8343
Exposto	8915		736	478	4,30726	71344	0,021451	1,82613	0,017431	0,187033	6,72171
Exposto	8912		1440	476	7,4164	71644	0,010426	0,713249	0,004021	0,043147	4,03686
Exposto	8911	30	1110	476	5,95899	71644	0,043142	1,39424	0,019889	0,213409	11,0836
Exposto	8910		796	477	4,57224	71494	0,034873	1,01611	0,015204	0,163134	23,3807
Exposto	8908		1362	475	7,07192	71795	0,011984	1,22041	0,005412	0,058065	4,86237
Exposto	8907		1066	475	5,76467	71795	0,070944	2,99815	0,070182	0,753047	12,6567
Exposto	8906		761	474	4,41767	71947	0,026604	2,39064	0,023984	0,257346	5,03981
Exposto	8905	28	1037	474	5,63659	71947	0,114565	2,0609	0,060204	0,645984	140,68
Exposto	8904		1006	472	5,49968	72250	0,042303	0,836903	0,01622	0,174034	16,7002
Exposto	8903	27	994	470	5,44669	72555	0,034274	0,578843	0,008943	0,095958	17,6976
Exposto	8900	64	878	463	4,93438	73631	0,028282	3,07342	0,033662	0,361187	9,30125
Exposto	8897		970	434	5,34069	78264	0,090837	0,30107	0,00282	0,030263	6,14686
Exposto	8893		1037	433	5,63659	78429	0,05153	2,27415	0,059808	0,641731	16,9975
Exposto	8892		1036	422	5,63218	80265	0,027802	0,449813	0,00802	0,086056	5,09381

Exposto	8890		992	423	5,43785	80097	0,021331	0,679199	0,005692	0,061072	10,9103
Exposto	8889		972	419	5,34953	80774	0,021691	0,553754	0,005836	0,062616	46,9932
Exposto	8888		912	419	5,08454	80774	0,015339	0,983854	0,008128	0,087215	5,62963
Exposto	8887		928	416	5,15521	81285	0,013662	0,738338	0,004719	0,050631	4,22538
Exposto	8886		884	418	4,96088	80944	0,050692	3,92825	0,095204	1,02153	9,02119
Exposto	8884		1360	413	7,06309	81800	0,060518	0,915754	0,004218	0,045262	4,48559
Exposto	8882		1241	400	6,53754	84068	0,011025	1,31718	0,006182	0,066329	4,09231
Exposto	8881		972	399	5,34953	84245	0,040505	0,849447	0,014858	0,159427	11,5887
Exposto	8879		1137	399	6,07823	84245	0,0145	1,35661	0,008801	0,094435	5,54669
Exposto	8878		992	399	5,43785	84245	0,030079	0,704289	0,008237	0,088386	4,28169
Exposto	8877	36	1038	398	5,64101	84423	0,033914	1,10213	0,019727	0,211671	13,635
Exposto	8870		1109	383	5,95457	87130	0,056683	0,492823	0,00677	0,072643	7,21154
Exposto	8869		885	386	4,9653	86582	0,065072	4,81533	0,130032	1,39523	36,9215
Exposto	8868		1037	385	5,63659	86764	0,035832	1,30284	0,022587	0,242354	48,8946
Exposto	8864		993	382	5,44227	87313	0,038588	1,00357	0,016536	0,177426	40,1479
Exposto	8863		971	381	5,34511	87497	0,05177	1,16485	0,022502	0,241443	108,199

Exposto	8862	66	912	381	5,08454	87497	0,026484	1,30284	0,017163	0,184162	32,6889
Exposto	8861	70	936	375	5,19054	88609	0,035352	1,70069	0,03347	0,359127	14,7114
Exposto	8859		1233	368	6,50221	89924	0,009587	0,679199	0,003178	0,034095	4,26018
Exposto	8855		992	351	5,43785	93199	0,036071	1,05554	0,021199	0,22746	11,7731
Exposto	8854		1038	351	5,64101	93199	0,025645	1,09317	0,016212	0,173958	6,50077
Exposto	8853		972	349	5,34953	93592	0,040505	0,999982	0,019648	0,210819	6,31677
Exposto	8848	56	790	341	4,54574	95180	0,034873	2,41573	0,028574	0,306597	19,9757
Exposto	8843		992	328	5,43785	97820	0,033195	0,69712	0,010464	0,112273	21,3966
Exposto	8842		1361	328	7,06751	97820	0,01474	1,3136	0,009387	0,100716	10,2495
Exposto	8841		1039	328	5,64543	97820	0,069027	3,94617	0,118317	1,26953	4,63769
Exposto	8840		972	328	5,34953	97820	0,04458	1,47847	0,026883	0,288455	66,4887
Exposto	8839		624	327	3,81262	98026	0,054766	1,50714	0,015475	0,166045	5,22619
Exposto	8838	72	912	329	5,08454	97614	0,051051	1,72578	0,041683	0,44725	76,7534
Exposto	8837		934	328	5,1817	97820	0,041584	1,37811	0,028864	0,309703	42,8798
Exposto	8835	59	886	327	4,96972	98026	0,055605	2,44978	0,054042	0,579868	59,5238
Exposto	8829		662	332	3,98044	97000	0,028402	3,58058	0,040625	0,435903	10,3018

Exposto	8827		1167	309	6,21073	101810	0,011984	1,6971	0,009994	0,107231	4,42142
Exposto	8826		665	309	3,99369	101810	0,020732	0,980269	0,009577	0,102765	7,62528
Exposto	8824		1137	308	6,07823	102024	0,012224	1,18994	0,006906	0,074103	5,13381
Exposto	8823		1006	312	5,49968	101169	0,040985	1,03045	0,016847	0,180765	8,27846
Exposto	8822		992	307	5,43785	102239	0,035712	0,582427	0,008638	0,092686	47,8018
Exposto	8814		1038	307	5,64101	102239	0,02996	1,03403	0,019288	0,206954	47,2343
Exposto	8813		970	304	5,34069	102887	0,047216	0,962349	0,023798	0,255355	69,4188
Exposto	8811		938	297	5,19937	104413	0,034873	0,883497	0,014383	0,154325	7,4191
Exposto	8807		1038	283	5,64101	107535	0,053088	1,61467	0,054225	0,581829	6,5689
Exposto	8806		994	284	5,44669	107309	0,023368	0,99819	0,011134	0,119472	5,16282
Exposto	8805		937	282	5,19495	107761	0,060039	1,40499	0,03818	0,409664	12,1214
Exposto	8804		964	283	5,3142	107535	0,058121	2,13795	0,062936	0,6753	85,3445
Exposto	8803		888	281	4,97855	107988	0,025046	0,939051	0,009488	0,101804	25,492
Exposto	8801		759	275	4,40883	109360	0,009707	0,410387	0,002033	0,021815	4,04525
Exposto	8800		1038	268	5,64101	110983	0,027083	0,648734	0,010877	0,116709	10,6424
Exposto	8799	85	663	271	3,98486	110284	0,026604	2,31179	0,020827	0,223476	18,1563

Exposto	8798		636	269	3,86562	110750	0,021092	1,69889	0,012531	0,134452	4,76797
Exposto	8796		1237	263	6,51987	112157	0,012943	0,736546	0,004142	0,044444	4,01896
Exposto	8795		888	262	4,97855	112393	0,050212	0,801061	0,02193	0,235309	18,1192
Exposto	8793		1136	262	6,07382	112393	0,010785	0,684576	0,004014	0,043073	4,78573
Exposto	8792		933	262	5,17729	112393	0,049853	0,91217	0,02449	0,262779	46,1567
Exposto	8785		943	250	5,22145	115267	0,040146	1,03762	0,019604	0,210348	0
Exposto	8784	60	970	253	5,34069	114542	0,056324	0,964141	0,024892	0,267084	80,7743
Exposto	8783		991	251	5,43344	115025	0,036191	0,508952	0,007218	0,077447	6,55714
Exposto	8782		1137	248	6,07823	115753	0,011984	0,942636	0,005221	0,056026	5,46569
Exposto	8781		1006	247	5,49968	115997	0,060398	1,01611	0,017674	0,189644	26,67
Exposto	8780		1028	246	5,59685	116241	0,052369	0,462357	0,004232	0,045405	11,1496
Exposto	8779		888	247	4,97855	115997	0,050092	1,27596	0,033777	0,36242	16,0726
Exposto	8778		1039	244	5,64543	116731	0,035113	1,22041	0,020931	0,224591	28,7362
Exposto	8774		999	231	5,46877	119968	0,041104	1,17381	0,020176	0,216485	4,99674
Exposto	8773		972	231	5,34953	119968	0,030798	0,953388	0,014741	0,158164	10,5648
Exposto	8772	80	888	223	4,97855	122005	0,053088	1,58958	0,039585	0,424743	6,69563

Exposto	8771		933	227	5,17729	120982	0,046377	1,72398	0,035085	0,376458	10,1294
Exposto	8769		1027	217	5,59243	123555	0,021092	0,259852	0,002749	0,029496	5,92669
Exposto	8768		1039	217	5,64543	123555	0,034034	0,754467	0,012364	0,132669	16,8377
Exposto	8767		1004	216	5,49085	123815	0,025526	0,992814	0,012613	0,135335	11,8247
Exposto	8763		1004	183	5,49085	132718	0,034034	1,82613	0,025681	0,275552	23,743
Exposto	8758		829	161	4,71798	139006	0,028162	0,494615	0,004262	0,045735	6,07238
Exposto	8756		854	155	4,82839	140772	0,038109	0,675615	0,004644	0,049834	6,78961
Exposto	8753		844	155	4,78423	140772	0,015819	0,706081	0,006266	0,067234	5,3185
Exposto	8751		829	152	4,71798	141664	0,016418	0,408595	0,003084	0,033088	6,59841
Exposto	8750		764	152	4,43091	141664	0,02936	1,48564	0,010422	0,11183	9,82817
Exposto	7450		426	1363	2,92193	16595	0,008988	0,381714	0,001215	0,023961	4,09034
Exposto	7436		765	1301	4,39219	18222	0,02984	0,399634	0,002513	0,049553	4,29645
Exposto	7435		792	1293	4,50929	18443	0,04446	0,412179	0,004744	0,093553	5,40428
Exposto	7430	0	801	1286	4,54833	18639	0,026484	7,36367	0,082828	1,6333	4,60412
Exposto	7420	84	1159	1178	6,10099	21589	0,176641	0,279565	0,016187	0,319202	208,163
Exposto	7418	55	515	1175	3,30793	21669	0,084246	5,54829	0,18775	3,7023	0

Exposto	7416		572	1097	3,55514	23855	0,009467	0,940844	0,003142	0,061965	4,33821
Exposto	7408	3	1017	972	5,48513	27828	0,010186	0,464149	0,001748	0,034468	5,00052
Exposto	7404	53	801	948	4,54833	28663	0,063035	7,18088	0,167379	3,3006	48,2055
Exposto	7403	63	1394	911	7,1202	30000	0,052609	1,51969	0,010796	0,212885	4,39948
Exposto	7401	4	729	905	4,23606	30318	0,019174	5,74542	0,045943	0,905957	12,9594
Exposto	7400		979	890	5,32032	31126	0,017856	2,95873	0,024835	0,489725	5,32014
Exposto	7394		1835	816	9,03284	35444	0,011025	0,551962	0,001876	0,036984	5,29762
Exposto	7392	68	798	812	4,53532	35693	0,058121	6,82246	0,106821	2,10643	36,185
Exposto	7387		1272	770	6,59108	38424	0,055605	0,374545	0,003257	0,064218	13,1431
Exposto	7386	9	1269	758	6,57807	39242	0,049253	0,596764	0,007315	0,144249	14,4554
Exposto	7384	71	967	769	5,26828	38492	0,017856	4,78845	0,036058	0,711033	5,35893
Exposto	7379	13	986	705	5,35068	43068	0,029241	4,02681	0,034516	0,680634	6,1762
Exposto	7372	90	1609	661	8,05266	47177	0,020612	3,99634	0,029468	0,581089	18,8822
Exposto	7370	73	363	646	2,6487	48971	0,017976	2,4892	0,021838	0,430627	12,0754
Exposto	7369		1176	635	6,17472	50329	0,041584	2,7849	0,016899	0,333245	6,86833
Exposto	7367		1177	612	6,17906	53291	0,015219	1,55194	0,011643	0,229591	4,48584

Exposto	7359	23	1134	606	5,99257	54093	0,033555	1,84047	0,013396	0,264165	9,65538
Exposto	7358	18	1104	608	5,86245	53824	0,031757	2,94618	0,034214	0,674668	25,5238
Exposto	7357	19	1066	605	5,69765	54227	0,101023	4,50888	0,126713	2,49869	4,48401
Exposto	7356		1173	596	6,16171	55455	0,026245	2,10211	0,01559	0,30742	4,61506
Exposto	7353	58	987	609	5,35502	53691	0,733648	3,23829	1,07461	21,1905	842,368
Exposto	7352	21	932	597	5,11648	55317	0,475877	2,80282	0,477874	9,42334	146,429
Exposto	7351	54	960	606	5,23792	54093	0,688829	2,38885	0,868491	17,126	743,269
Exposto	7349	83	738	583	4,27509	57277	0,015699	1,95516	0,012008	0,236791	4,24959
Exposto	7348	20	362	584	2,64436	57135	0,043262	2,86196	0,041781	0,823884	72,3567
Exposto	7347	74	385	582	2,74411	57420	0,033675	1,27776	0,019732	0,389099	22,6089
Exposto	7346	22	672	580	3,98885	57706	0,084006	5,34399	0,128612	2,53615	136,016
Exposto	7345		401	578	2,81351	57994	0,034154	1,23116	0,019192	0,378461	16,0534
Exposto	7344		627	571	3,79368	59012	0,031997	0,684576	0,004344	0,085664	4,14621
Exposto	7343		415	577	2,87423	58138	0,037509	1,06808	0,018609	0,366951	35,1278
Exposto	7341		808	578	4,57869	57994	0,023488	4,02681	0,036359	0,716966	5,7486
Exposto	7340	62	446	576	3,00867	58283	0,040505	3,79205	0,045371	0,894679	0

Exposto	7337		1264	563	6,55638	60198	0,017736	1,50177	0,00868	0,171155	4,57713
Exposto	7334		1105	558	5,86679	60951	0,026724	1,31897	0,008481	0,167237	8,00101
Exposto	7333	75	1178	559	6,1834	60800	0,019414	3,13435	0,022772	0,449044	28,9498
Exposto	7332	24	1135	559	5,9969	60800	0,023009	1,37274	0,007054	0,139091	4,90141
Exposto	7323		988	512	5,35936	67794	0,02241	1,32793	0,011748	0,231662	5,65178
Exposto	7319		1329	502	6,83829	69105	0,011984	0,813606	0,004168	0,082181	4,32421
Exposto	7318	26	733	497	4,25341	69770	0,027083	0,643358	0,002677	0,05278	7,52765
Exposto	7316	82	1177	498	6,17906	69637	0,017616	1,38528	0,00908	0,179052	27,7742
Exposto	7313		1135	496	5,9969	69904	0,019414	1,05733	0,008073	0,159199	28,6054
Exposto	7312	30	1162	495	6,114	70038	0,017257	0,887081	0,00558	0,110036	12,3721
Exposto	7311	61	867	494	4,83457	70173	0,047336	6,25437	0,122373	2,41311	0
Exposto	7310	27	1089	494	5,7974	70173	0,023249	0,695328	0,008268	0,16304	17,8969
Exposto	7308		1106	496	5,87113	69904	0,027683	1,57882	0,015891	0,313358	44,163
Exposto	7307	57	1030	493	5,54151	70307	0,064832	4,74544	0,113695	2,24199	0
Exposto	7304		989	488	5,36369	70984	0,025526	0,956972	0,011728	0,231273	55,6398
Exposto	7302		363	486	2,6487	71256	0,017496	2,93364	0,024594	0,484982	8,96777

Exposto	7301	64	947	481	5,18154	71942	0,039427	4,5053	0,058387	1,15134	6,2571
Exposto	7293		1105	452	5,86679	76052	0,013901	1,03941	0,007141	0,140819	6,54452
Exposto	7292		990	449	5,36803	76490	0,041464	3,15227	0,052747	1,04012	4,00373
Exposto	7291		989	435	5,36369	78570	0,018815	0,867368	0,007369	0,145321	24,4972
Exposto	7284		1178	415	6,1834	81638	0,012463	0,899626	0,004751	0,09368	14,7322
Exposto	7281		1136	410	6,00124	82424	0,013182	1,3817	0,008628	0,170142	9,48358
Exposto	7279		1163	409	6,11834	82582	0,013062	0,863784	0,00493	0,097208	7,05037
Exposto	7278	36	1106	409	5,87113	82582	0,017976	1,28313	0,009432	0,186001	22,7552
Exposto	7277		1091	407	5,80607	82899	0,011864	1,01073	0,005826	0,114876	6,52801
Exposto	7275		1006	395	5,43742	84827	0,036551	0,874536	0,013551	0,267214	13,6709
Exposto	7273		987	394	5,35502	84989	0,043621	1,57166	0,030072	0,593002	73,7785
Exposto	7272	78	732	391	4,24907	85479	0,013182	1,62004	0,010421	0,205503	5,70105
Exposto	7269		1107	380	5,87546	87300	0,020612	0,659487	0,004266	0,084131	4,29538
Exposto	7264		1299	355	6,70818	91582	0,010905	0,715041	0,003265	0,064379	4,48198
Exposto	7263		1137	355	6,00558	91582	0,024926	0,661279	0,003364	0,066345	5,38467
Exposto	7261		1179	355	6,18773	91582	0,011744	0,637982	0,002938	0,057942	10,0891

Exposto	7260		1163	355	6,11834	91582	0,012583	0,519704	0,002978	0,05873	5,82132
Exposto	7259		1091	354	5,80607	91758	0,009707	0,345872	0,001332	0,026265	4,37058
Exposto	7254		1106	353	5,87113	91934	0,043381	0,68816	0,005535	0,109155	12,2383
Exposto	7252	56	860	347	4,80421	92997	0,02253	2,24369	0,022999	0,453529	0
Exposto	7250		809	342	4,58302	93892	0,019653	1,9695	0,01408	0,277649	7,69758
Exposto	7247		1107	332	5,87546	95708	0,015939	0,424724	0,00343	0,067627	6,2698
Exposto	7246		1005	335	5,43309	95159	0,050692	0,872744	0,018805	0,370813	8,40169
Exposto	7244	59	988	335	5,35936	95159	0,072862	4,41569	0,124664	2,45829	98,3609
Exposto	7239		1186	318	6,21809	98310	0,012703	0,464149	0,002724	0,053724	4,03769
Exposto	7234		1028	310	5,53284	99828	0,038828	0,768804	0,012753	0,251477	5,84574
Exposto	7232		996	308	5,39405	100211	0,0441	1,72219	0,037998	0,7493	66,5993
Exposto	7229	85	701	299	4,11462	101954	0,011624	0,838695	0,0045	0,088738	16,0091
Exposto	7224		1006	285	5,43742	104725	0,02948	0,716833	0,012378	0,244088	17,4475
Exposto	7219		992	285	5,3767	104725	0,028162	1,06271	0,017191	0,338992	33,5591
Exposto	7218		1107	270	5,87546	107778	0,013542	0,424724	0,003162	0,062351	6,12062
Exposto	7217		1091	268	5,80607	108192	0,009108	0,557338	0,002669	0,052631	4,47555

Exposto	7215		993	263	5,38104	109233	0,049014	0,22401	0,001934	0,038135	7,20295
Exposto	7212		707	263	4,14064	109233	0,017496	1,83151	0,010269	0,202488	5,70282
Exposto	7209		935	252	5,12949	111559	0,035352	2,56268	0,036089	0,711643	12,9635
Exposto	7206		998	249	5,40273	112202	0,061956	2,88346	0,076517	1,50886	86,9692
Exposto	7205		1108	226	5,8798	117257	0,05956	0,754467	0,005156	0,101676	8,02057
Exposto	7203		1090	238	5,80173	114592	0,015939	1,16665	0,010394	0,204961	7,36552
Exposto	7202		1006	225	5,43742	117482	0,061237	2,9193	0,055741	1,09917	21,6756
Exposto	7201		993	227	5,38104	117032	0,050811	0,928299	0,022874	0,451064	35,446
Exposto	7200	80	859	223	4,79988	117933	0,011864	0,804645	0,003596	0,070905	5,68917
Exposto	7198		1092	216	5,81041	119525	0,013781	0,508952	0,003699	0,072934	5,17478
Exposto	7196		1093	197	5,81475	123955	0,02241	0,663071	0,006586	0,129876	9,6665
Exposto	7195		1004	181	5,42875	127813	0,025286	0,874536	0,009173	0,180894	17,2081
Exposto	7190		1003	163	5,42441	132298	0,039187	3,49635	0,058128	1,14624	15,8176
Exposto	7189		935	153	5,12949	134857	0,023488	2,11824	0,01849	0,3646	4,39036
Exposto	7183		989	128	5,36369	141472	0,078614	1,21682	0,019495	0,384424	9,67703
Exposto	7182		1014	128	5,47212	141472	0,066989	2,72576	0,06129	1,20859	100,729

Exposto	7169	1045	108	5,60657	146998	0,027323	1,0412	0,016935	0,333939	16,4049
----------------	------	------	-----	---------	--------	----------	--------	----------	----------	---------

ANEXO 3

N° de identificação	Match ID	Max	Match Count	Controle	Exposto	Anova
1	107	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	3E-05
2	115	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	1E-04
3	103	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	2E-04
4	53	1,55154	2	-1,55154	1,55154	2E-04
5	94	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,002
6	108	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,004
7	71	4,04487	2	-4,04487	4,04487	0,004
8	98	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,005
9	90	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,006
10	113	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,006
11	117	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,015
12	101	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,018
13	19	1,13345	2	1,13345	-1,13345	0,018
14	40	2,06887	2	2,06887	-2,06887	0,022
15	118	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,022
16	70	1,71381	2	1,71381	-1,71381	0,024
17	85	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,025
18	102	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,026
19	37	1,70453	2	1,70453	-1,70453	0,027
20	100	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,028
21	97	1,00E+06	1	1,00E+06	1,00E+06	0,029
22	33	1,66077	2	1,66077	-1,66077	0,029
23	68	1,7373	2	-1,7373	1,7373	0,03
24	22	1,11638	2	1,11638	-1,11638	0,05
25	30	1,86281	2	-1,86281	1,86281	0,051
26	75	1,218	2	-1,218	1,218	0,059