

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANÁLISE POR
MICROSSATÉLITES DE DNA DE ISOLADOS DE CAMPO
DO *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907, OBTIDOS EM ESTEIO,
RIO GRANDE DO SUL.

RAFAEL LUCYK MAURER

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS – ZOOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANÁLISE POR MICROSSATÉLITES
DE DNA DE ISOLADOS DE CAMPO DO *Schistosoma mansoni* SAMBON,
1907, OBTIDOS EM ESTEIO, RIO GRANDE DO SUL.

Rafael Lucyk Maurer
Orientador: Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2005

ii

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
DEDICATÓRIA.....	ix
AGRADECIMENTOS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 O parasito.....	1
1.2 Aspectos gerais da esquistossomose.....	2
1.3 Morfologia do <i>S. mansoni</i>	5
1.3.1 Aparência externa.....	6
1.3.2 Macho.....	6
1.3.3 Fêmea.....	7
1.4 Diversidade morfológica e morfométrica em <i>S. mansoni</i>	7
1.5 Genoma do <i>S. mansoni</i>	8
1.6 Diversidade gênica em <i>S. mansoni</i>	9
1.7 Microssatélites na análise populacional.....	11
1.8 Microssatélites na parasitologia.....	14
2. Justificativa.....	15
3. Objetivos.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17

4. Materiais e métodos	18
4.1 Análise morfológica dos vermes.....	18
4.1.1 Coloração.....	18
4.1.2 Morfometria.....	19
4.2 Análise estatística dos dados morfológicos.....	19
4.3 Análise molecular.....	20
4.4 Extração de DNA.....	20
4.5 Análise de microsatélites.....	21
4.6 Iniciadores para PCR de microsatélites.....	21
4.7 PCR de microsatélites.....	22
4.8 Determinação do tamanho dos alelos de microsatélites.....	23
4.9 Análise dos dados obtidos com microsatélites: parâmetros de genética de populações	23
5. Resultados	25
5.1 Morfologia.....	25
5.2 Análise com microsatélites.....	30
5.3 Análise interpopulacional.....	34
6. Discussão	36
7. Conclusão	40
Referências bibliográficas	41
APÊNDICE	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do <i>S.mansoni</i>	2
Figura 2 – Distribuição da esquistossomose no país de acordo com a prevalência de infecção humana.....	3
Figura 3 – Fluxo migratório humano e distribuição dos hospedeiros intermediários da esquistossomose.....	5
Figura 4 – Microssatélites com repetições em tandem CT.....	11
Figura 5 – Representação esquemática do processo de deslizamento das fitas de DNA durante a replicação.....	13
Figura 6 – Distribuição das freqüências alélicas para os quatro <i>loci</i> dos isolados Esteio e JV.....	32
Figura 7 – Distribuição das freqüências alélicas para os 4 <i>loci</i> das cepas de LE e MAP.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista das seqüências de <i>Schistosoma mansoni</i> contendo os microsatélites utilizados no trabalho, n° de acesso no banco de dados, repetições e classificação das repetições.....	21
Tabela 2 - Seqüências dos iniciadores, temperaturas de anelamento e número das seqüências com <i>loci</i> de microsatélites estudados.....	22
Tabela 3 - Valores mínimos e máximos, médios e desvio padrão em milímetros das mensurações realizadas em machos e fêmeas através de microscopia óptica do Isolado Esteio. O n° de lobos está representado em unidades.....	26
Tabela 4 - Valores mínimos e máximos, médios e desvio padrão em milímetros das mensurações realizadas em machos e fêmeas através de microscopia óptica do Isolado JV. O n° de lobos está representado em unidades.....	28
Tabela 5 - Valor médio dos caracteres analisados em milímetros e análise de variância dos isolados Esteio e JV para vermes machos. Diferenças significativas para $p < 0,05$	29
Tabela 6 - Valor médio dos caracteres analisados em milímetros e análise de variância dos isolados Esteio e JV para vermes fêmeas. Diferenças significativas para $p < 0,05$	29
Tabela 7 -. Número de alelos, heterosigozidade esperada (H_e) e observada (H_o) para cada <i>locus</i> examinado nos isolados de campo e cepas de laboratório.....	31
Tabela 8 - Estimativa das distâncias genéticas entre os pares das populações utilizando F_{ST}	34
Tabela 9 - Estimativa da distância genética entre os pares das populações utilizando R_{ST}	35

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma, 10 ⁻⁶ gramas
µL	Microlitro, 10 ⁻⁶ litros
µM	Micromolar, 10 ⁻⁶ molar
A	Adenina
AFA	Álcool Formol Acético
AP-PCR	Reação em cadeia da polimerase com iniciadores arbitrários – “Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction”
C	Citosina
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DNA	Ácido desoxiribonucléico – “Desoxyribonucleic acid”
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Tri Fosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EST	Etiqueta de Seqüência Transcrita – “Expressed Sequence Tag”
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
fmol	Fentamoles, 10 ⁻¹⁵ moles
F _{ST}	Índice de fixação
G	Guanina
Kb	Kilobase, 10 ³ bases
M	Molar
mL	Mililitro, 10 ⁻³ litros
mM	Milimolar, 10 ⁻³ molar
mm	Milímetro, 10 ⁻³ metros
NCBI	Centro Nacional para Informações em Biotecnologia – “National Center for Biotechnonology Information”
ng	Nanograma, 10 ⁻⁹ gramas
nm	Nanômetro, 10 ⁻⁹ metros
ORF	Janela de leitura aberta – “Open reading frame”
p/v	Peso por volume
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase – “Polymerase Chain Reaction”
pH	Potencial hidrogeniônico

pmol	Picomoles, 10^{-12} moles
PRE	Elemento repetitivo polimórfico – “Polymorphic Repetitive Element”
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso – “Random Amplified Polymorphic DNA”
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição – “Restriction Fragment Length Polymorphism”
RNA	Ácido ribonucléico – “Ribonucleic acid”
rpm	Rotações por minuto
R _{ST}	Índice de fixação análogo ao F _{ST} , porém, utilizado para microssatélites
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SSR	Repetições de seqüências simples – “Simple Sequence Repeats”
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris borato EDTA
Tris	Tri-hidroximetil amino metano
v/v	Volume por volume
WHO	Organização Mundial da Saúde – “World Health Organization”

DEDICATÓRIA

A meu pai (*in memoriam*), minha mãe, meus irmãos, meu cunhado e aos meus sobrinhos. Aos inúmeros camundongos que perderam a vida para a realização desse trabalho. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira por ter me aceito como orientado e ter me apresentado ao mundo da ciência.

A Fernanda Teixeira dos Santos por ter me aceitado como estagiário no laboratório e agüentado os meus erros de principiante.

A professora Ana Cristina pela amizade, pela paciência nos dias de estresse e pelo auxílio na correção da dissertação.

A professora Cinara pela amizade e apoio nas apresentações.

Aos colegas de laboratório: Renata, Caroline, Candida, Paula, Cecília, Juliana, Pablo, Alex, Sabine, Rafael e aos que saíram ou entraram no decorrer do meu mestrado.

Ao colega Juliano Romanzini por ter me auxiliado na preparação de lâminas e muitas outras atividades referentes aos meus experimentos.

A minha namorada por ter agüentado dias de estresse, mau humor e, é claro, pela força, carinho e paixão dedicada. Minha vida.

A Profa. Dr. Anna Kohn e equipe do Laboratório de Helminhos Parasitos de Peixes do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – RJ pelos ensinamentos nas técnicas de morfologia de parasitas.

Ao Dr. Guilherme Côrrea-Oliveira e equipe do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou da FIOCRUZ – MG pela oportunidade de aprender as técnicas em microssatélites.

Ao Dr. Álvaro José Romanha e sua equipe por terem me recebido com carinho e pelo convívio nos dias que fiquei em Minas Gerais.

Aos amigos que fiz em Belo Horizonte: Nilton, Maureen, Bernardo, Luciana, Fernanda(s), Regina que me deram apoio e muita ajuda nos meus experimentos.

Aos Laboratórios de Pneumologia, coordenado pela Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado e Laboratório de Patologia Geral e Buco-Dental, coordenado pelo Prof. João Miguel Messina da Cruz pela permissão do uso dos equipamentos de microscopia.

Aos meus amigos da PUC-RS em geral pelo apoio e ajuda.

Aos meus amigos de São Borja.

Aos meus primos, Eraldo e Maria da Graça, pelo carinho, amizade e ao apoio dado quando na minha ausência eram solicitados.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

As secretárias Luiza e Josi do curso de Pós em Zoologia.

A PUC-RS pela oportunidade e pelo fornecimento da estrutura física.

RESUMO

A esquistossomose mansônica foi detectada no Rio Grande do Sul pela primeira vez em 1997, constituindo o foco mais meridional das Américas. A partir daquela data, vários trabalhos foram desenvolvidos para caracterizar epidemiologicamente este foco de transmissão de ultra baixa endemicidade e de recente introdução. O objetivo desse trabalho é caracterizar morfológicamente o parasito e analisar a estrutura populacional através de marcadores microssatélites, comparando com as cepas de laboratório LE e MAP. Dois isolados de campo chamados de “Esteio” e “JV” foram obtidos, respectivamente, a partir de fezes e moluscos naturalmente infectados e de um paciente. Os vermes adultos, obtidos de camundongos experimentalmente infectados, foram fixados, clarificados e corados para as mensurações com auxílio de um microscópio óptico. A análise molecular foi realizada com 4 marcadores microssatélites. Morfológicamente, o parasito, quando comparado com dados obtidos da bibliografia, não apresentou diferenças notáveis. As pequenas variações observadas podem ser atribuídas à plasticidade fenotípica das populações desse trematódeo. O uso de 4 marcadores microssatélites nos permitiu encontrar um número menor de alelos nos isolados de campo quando comparado com as cepas de laboratório. Há uma grande divergência genética encontrada ($R_{ST} < 0,253$) quando comparados os isolados de campo e as cepas de laboratório.

Morphological characterization and microsatellite analysis of field strains of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, from Esteio, Rio Grande do Sul.

ABSTRACT

Intestinal schistosomiasis was detected in Rio Grande do Sul for the first time in 1997, becoming the southernmost focus in the Americas. Starting from that date, several investigations were undertaken for the epidemiological characterization of this transmission focus of very low endemicity and recent introduction. The objective is to describe the parasite morphology and to analyze the population structure using microsatellite markers, comparing field isolates with laboratory strains, LE and MAP. Two isolates called "Esteio" and "JV" were obtained respectively, from feces and mollusks naturally infected and from a single patient. The adult worms, obtained from the experimental infection of mice were fastened, clarified and stained for the measurements taken with an optical microscope. Molecular analysis was performed with 4 microsatellite markers. The morphological data of adult worms did not differ from those reported in the literature. The small variance in measurements can be attributed to phenotypic plasticity of the populations of that trematode. The use of 4 microsatellite markers allowed the detection of a smaller number of alleles in the field strains when compared to the findings with the laboratory strains. There is a great genetic divergence found ($R_{ST} < 0,253$) when compared isolates and laboratory strains.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O parasito

O *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, é um trematódeo digenético (Trematoda: Digenea), parasito do homem e de alguns mamíferos, em cujas veias do sistema portal se localizam os vermes adultos. Pertence à família *Schistosomatidae*, cujas formas adultas são dióicas, possuem duas ventosas, tubo digestivo formado inicialmente por esôfago único, o qual em seguida se bifurca para posteriormente se unir em um só ramo terminal, o ceco (CUNHA, 1970).

Esta espécie desenvolve sua fase adulta como parasito da luz dos vasos sangüíneos, habitando preferencialmente as vênulas do plexo hemorroidário superior e os ramos mais finos das veias mesentéricas, particularmente da mesentérica inferior. Aí as fêmeas põem seus ovos.

Depois de atravessarem a mucosa intestinal, os ovos são eliminados com as fezes (letra B da figura 1) e, quando chegam em tempo útil a uma coleção de água doce superficial, libertam suas larvas (C)– miracídios – que nadam durante algum tempo até encontrarem moluscos do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910. Após penetrar nos tecidos do molusco (D), o miracídio transforma-se em um novo tipo larvário, o esporocisto, que, por poliembrionia, gera esporocistos primários e, depois, larvas infectantes para os hospedeiros vertebrados, as cercárias (E). Voltando ao meio líquido, as cercárias que abandonaram o hospedeiro invertebrado ficam nadando na água, quase sempre em direção a superfície, até que tenham a oportunidade de entrar em contato com a pele do hospedeiro vertebrado (homem ou outro animal suscetível), através da qual penetram ativamente. Cada cercária que consegue sobreviver transforma-se logo em esquistossômulo, última forma larvária do parasito, figura 1.

Os esquistossômulos que não forem destruídos na pele ganham a circulação geral e vão ao coração, depois aos pulmões (onde também podem ser retidos e destruídos) e, em seguida ao fígado e, acidentalmente a outros lugares. Somente os que chegam ao sistema porta intra-hepático podem completar seu desenvolvimento e alcançar a fase adulta (A).

A infecção humana por *S. mansoni* costuma ser, na maioria das vezes, assintomática ou oligossintomática; mas pode produzir alterações

anatomopatológicas cujo caráter e gravidade cobre extensa gama de situações, o que imprime a essa doença grande polimorfismo e, em muitos casos, prognóstico incerto. Em algumas áreas endêmicas, 4 a 5% dos pacientes desenvolvem lesões hepatoesplênicas graves (REY, 2001).

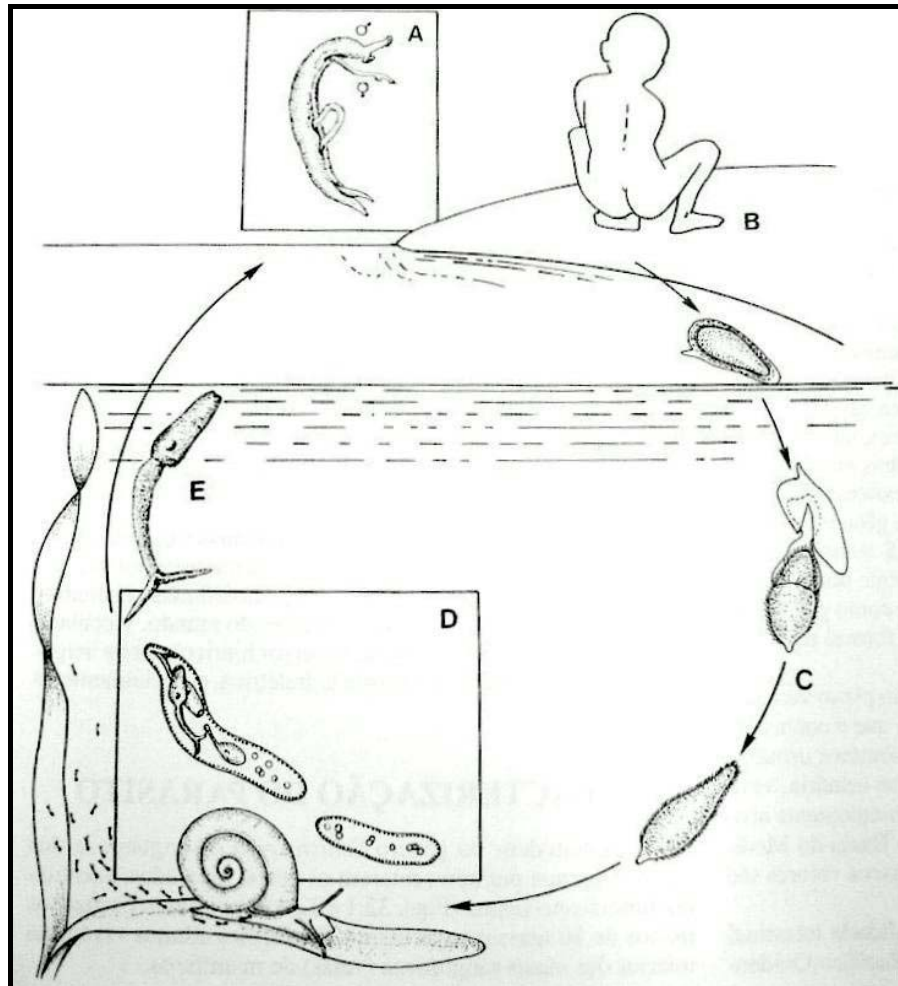


Figura 1: Ciclo de vida do *S. mansoni* (REY, 2002).

1.2 Aspectos gerais da esquistossomose

A esquistossomose é endêmica em 76 países distribuídos pela África, Ásia e América. Segundo CHITSULO *et al.* (2000) cerca de 200 milhões de pessoas estão infectadas e 652 milhões de pessoas estão em risco de adquirir a infecção. Acredita-se que 85% dos infectados vivam no continente africano (CHITSULO *et al.*, 2000). No Brasil, apenas o *S. mansoni* está presente infectando mais de 15 milhões de pessoas distribuídas por 19 estados (COURA & AMARAL, 2004) e 25 milhões em risco (WHO, 2001), figura 2.

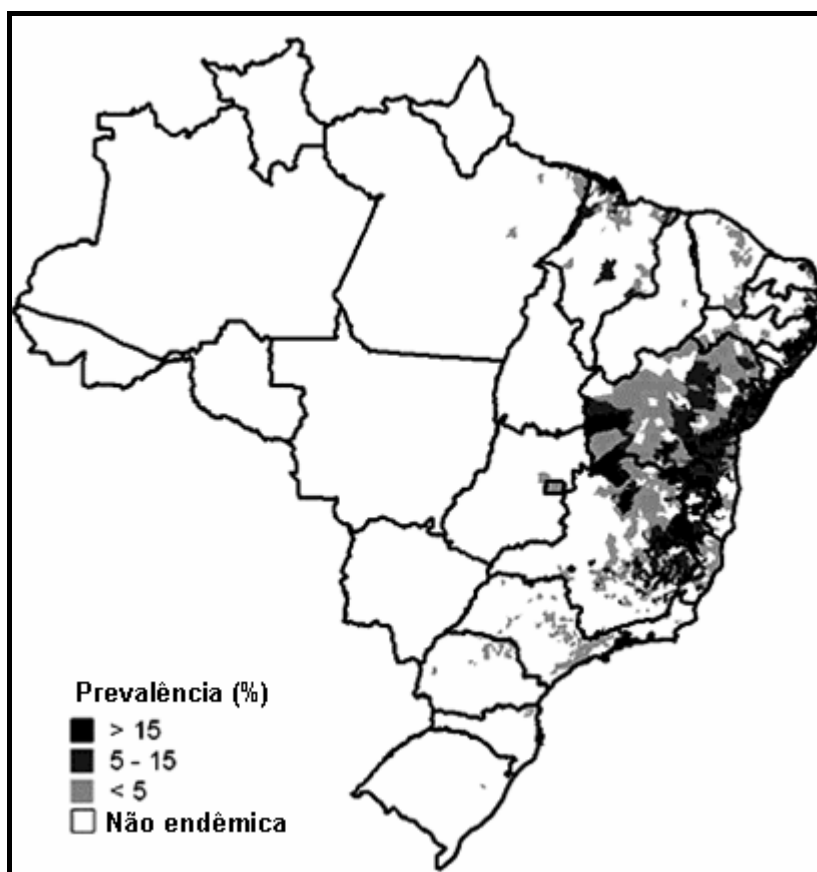


Fig. 2: Distribuição da esquistossomose de acordo com a prevalência da infecção humana (COURA & AMARAL, 2004).

O parasitismo humano por *S. mansoni* parece ser decorrente de uma linhagem de parasitos que evoluiu anteriormente em roedores (COMBES, 1990). Admite-se que esta espécie tenha surgido na Ásia e migrado para a África (SNYDER & LOKER, 2000). Ao longo desse processo evolutivo, foram selecionadas subpopulações devido ao desenvolvimento do helminto em diversas ordens de vertebrados e espécies de moluscos da família Planorbidae (FRANSEN, 1979; PITCHFORD, 1979).

A introdução da esquistossomose no país se deu, provavelmente, a partir de meados do século XVI, com o ingresso de populações africanas, ocupadas em regime de escravidão com a cultura da cana-de-açúcar na região Nordeste (SNYDER & LOKER, 2000). Condições ecológicas favoráveis e a presença do hospedeiro intermediário, caramujo do gênero *Biomphalaria*, determinaram a instalação da esquistossomose mansônica no Brasil (PESSÔA *et al.*, 1988).

Com a abolição da escravatura e com a inauguração dos grandes ciclos da economia brasileira (ouro, algodão, café), ocorreu migração interna e a dispersão da esquistossomose para novas áreas: inicialmente, Pernambuco e Bahia, expandindo-

se posteriormente para todo o Nordeste, Sudeste, Pará, Paraná e, mais recentemente, Santa Catarina, Goiás e Distrito Federal, onde foram registrados casos autóctones (KATZ, 1997).

A industrialização, com a instalação de fábricas de grande porte que alimentam o sonho de melhores salários, estimula o fluxo migratório nas áreas rurais, aumentando a densidade populacional na periferia das grandes cidades. Aliada à falta de saneamento básico e à educação sanitária deficiente, contribui para o crescimento e alastramento da doença (SANTOS, 1996), figura 3.

A chegada da esquistossomose no Rio Grande do Sul já havia sido alertada por CUNHA-NETO, 1972 e por PARAENSE & CORRÊA, 1987. Em 1997 foi descoberto o primeiro caso autóctone no estado do Rio Grande do Sul, no município de Esteio, região metropolitana de Porto Alegre (GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*, 1999). Com isso o RS passou a ter o foco mais meridional de transmissão da América. Na mesma época, foi descoberta a presença da *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) no município de Esteio, até então não descrita no Rio Grande do Sul (CARVALHO *et al.*, 1998).

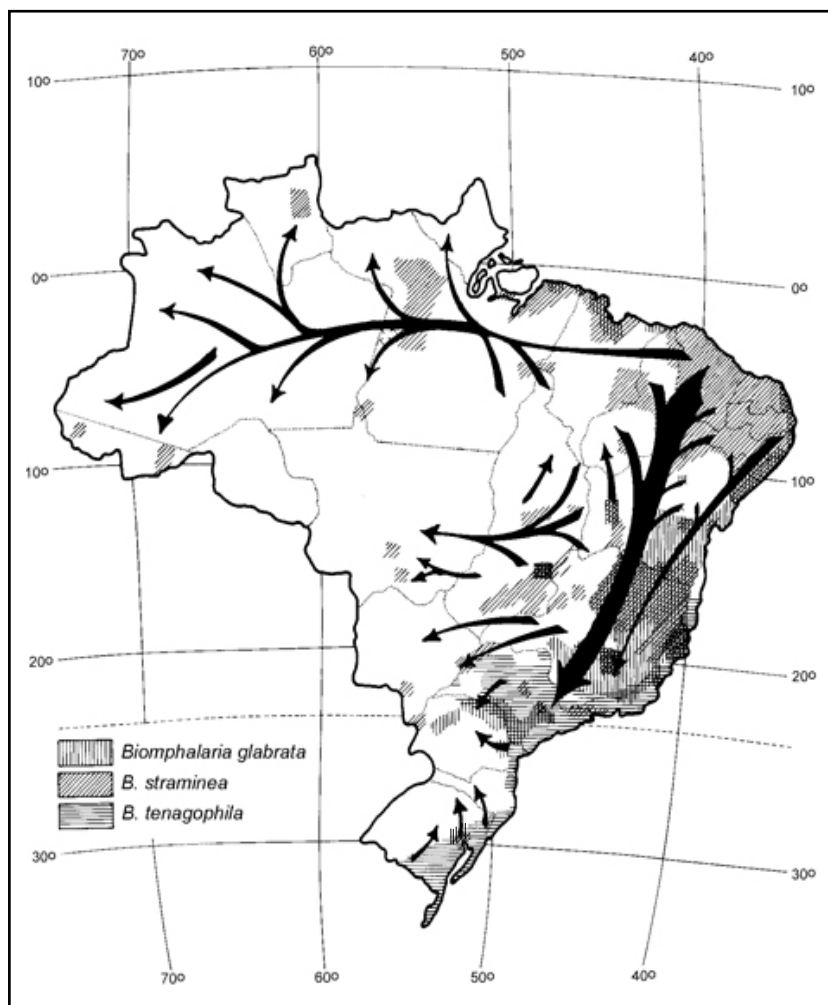


Fig. 3: Fluxo migratório humano e distribuição dos hospedeiros intermediários da esquistossomose (COURA & AMARAL, 2004).

Em 2000 conseguiu-se isolar o parasito da natureza a partir de fezes humanas de dois pacientes juntamente com moluscos naturalmente infectados, e “Esteio” foi nome dado ao isolado. Em 2002, na reunião técnica sobre áreas de baixa endemicidade de esquistossomose, promovida pelo Ministério da Saúde em Porto Alegre criticou-se a maneira como foi isolado em laboratório o parasito. Então, novamente, o *S. mansoni* foi re-isolado de um único paciente, chamando-se isolado “JV”.

1.3 Morfologia do *S. mansoni*

A exposição a seguir resume os dados pesquisados nas seguintes fontes: KASTNER *et al.*, 1975; KOHN *et al.*, 1979b; PARAENSE & CORRÊA, 1981;

RODRIGUEZ, 1986; MACHADO-SILVA *et al.*, 1994, 1995, 1998; CONCEIÇÃO *et al.*, 2000; REY, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003.

1.3.1 Aparência externa

Tanto o macho quanto a fêmea é cilíndrico, afinando-se para as extremidades. Ambos são de cor leitosa, sendo a fêmea geralmente mais escura por apresentar maior quantidade de pigmento sangüíneo, a hemozoína, no interior do sistema digestivo. Apresentam estes vermes na extremidade anterior, duas ventosas, uma oral ou anterior que circunda a boca e uma posterior ou ventral, também chamada de acetábulo, que é pedunculada e cuja função é a de fixar o parasito à parede capilar. Sob o acetábulo estes parasitos apresentam a abertura do orifício genital para o exterior.

1.3.2 Macho

Com um comprimento entre 4,08 e 14,0 mm e largura do corpo a nível testicular variável, geralmente entre 0,21 e 0,55 mm, o macho apresenta uma acentuada curvatura ventral. A parte anterior do corpo é curta e mais ou menos cilíndrica, encontrando-se nela as duas ventosas. A ventosa oral varia de 0,16 a 0,24 mm de comprimento por 0,16 a 0,28 mm de largura e o acetábulo 0,21 a 0,31 mm de comprimento por 0,17 a 0,30 mm de largura. A distância entre a extremidade anterior da ventosa oral e anterior da acetabular varia de 0,34 a 0,57 mm. O segmento posterior ao acetábulo é mais largo e achatado formando com as suas margens justapostas e curvadas ventralmente, formando o canal ginecóforo. Por não possuir órgão copulador, o esperma do macho é derramado no canal ginecóforo, penetrando no orifício vaginal da fêmea que se encontra ali alojada.

O aparelho genital masculino compreende 6 a 8 lobos testiculares, situados dorsalmente ao nível do início do canal ginecóforo, abaixo do acetábulo; variando de 0,04 a 0,11 mm de comprimento e 0,04 a 0,13 mm de largura. Os lobos são intercomunicados e os espermatozoides dirigem-se para a vesícula seminal através de um canal deferente único antes de atingirem o exterior pelo orifício genital.

1.3.3 Fêmea

Com um comprimento entre 6,43 e 17,00 mm e largura ao nível do ovário variável, geralmente entre 0,05 e 0,22 mm, a fêmea é, portanto, mais comprida e filiforme que o macho. As duas ventosas são pequenas, variando de 0,06 a 0,10 mm de comprimento e 0,05 a 0,09 mm de largura a ventosa oral. A ventosa ventral mede de 0,04 a 0,07 mm de comprimento por 0,03 a 0,06 mm de largura. A distância entre as ventosas varia de 0,14 a 0,30 mm de comprimento.

O aparelho genital feminino possui um ovário oblongo, ligeiramente lobado, e fica na metade anterior do corpo. O ovário mede em seu comprimento de 0,33 a 0,58 mm e na sua largura de 0,07 a 0,14 mm. Um oviduto curto conduz ao oótipo, que se continua com o tubo uterino. Neste encontram-se 1 ou 2 ovos, raramente 3 ou 4, o comprimento do ovo uterino varia de 0,09 a 0,17 mm e com largura oscilando entre 0,04 a 0,07 mm. O espinho do ovo possui a variação de 0,02 a 0,03 mm de comprimento. Os dois terços posteriores do corpo estão ocupados pelas glândulas vitelogênicas e seu canal sinuoso, que se une ao oviduto pouco antes deste alcançar o oótipo.

1.4 Diversidade morfológica e morfométrica em *S. mansoni*

Os estudos morfológicos e morfométricos de vermes adultos de *S. mansoni* são usados para esclarecer questões taxonômicas da principal espécie conhecida a infectar o homem (SAMBON, 1907; PIRAJÁ DA SILVA, 1908), detectar diferenças nos vermes recuperados de diferentes hospedeiros (KASTNER *et al.*, 1975; DIAS & PIEDRABUENA, 1980; MACHADO-SILVA *et al.*, 1994; NEVES *et al.*, 1998) e de parasitos provenientes de diferentes cepas (MAGALHÃES & CARVALHO, 1973; PARAENSE & CORRÊA, 1981; MACHADO-SILVA *et al.*, 1995). O isolamento em laboratório do parasito de um foco de introdução recente é uma oportunidade excelente para a caracterização morfológica e morfométrica, além de determinar as características biológicas desse organismo.

1.5 Genoma do *S. mansoni*

O *S. mansoni* tem um genoma diplóide com 7 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais (SHORT & MENZEL, 1960; SHORT *et al.*, 1979). A fêmea é heterogamética, possuindo o par de cromossomos ZW e o macho o par ZZ (MENZEL & SHORT, 1960; SHORT & GROSSMAN, 1981). O tamanho do genoma haplóide é de aproximadamente $2,7 \times 10^8$ pb, consistindo de cerca de 4-8% de seqüências de DNA altamente repetitivas (>1000 cópias), 35-40% de seqüências de DNA de média repetitividade (~100 cópias) e o restante de seqüências de cópia única (SIMPSON *et al.*, 1982). Nos humanos, a parte final dos cromossomos, ou telômeros, consiste de centena a milhares de repetições em tandem da seqüência TTAGGG (MOYZIS *et al.*, 1988; MEYNE *et al.*, 1989). HIRAI & LoVERDE, 1996, utilizando ensaio de hibridização *in situ* identificaram essa seqüência nos 8 pares cromossomais na metáfase mitótica do *S. mansoni*. Estima-se que o genoma contenha de 13.960 a 14.205 genes (VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2003).

O complexo gênico codificante do RNA ribossomal (rRNA) foi a primeira região repetitiva de DNA descrita para *S. mansoni* (SIMPSON *et al.*, 1984). Este complexo ocorre como uma unidade de 10 Kb, repetida em tandem, com uma abundância em torno de 100 unidades por genoma haplóide. Cada unidade repetitiva de rDNA codifica as três espécies conservadas de rRNA de eucariotos: 5,8S, 18S, e 28S, cujas regiões codificadoras são intercaladas por DNA espaçador não transcrito (SIMPSON *et al.*, 1984; VAN KEULEN *et al.*, 1985). A família de rDNA é polimórfica com aproximadamente 10% das unidades repetitivas mostrando heterogeneidade de tamanho (SIMPSON *et al.*, 1984). A análise de seqüências de rDNA nuclear (5,8S, 18S e 28S) e rDNA mitocondrial (16S rDNA) de várias espécies de *Schistosoma* permitiram estudos filogenéticos de grande importância, assim como a discriminação entre espécies, cepas, e até mesmo entre populações de *S. mansoni* sensíveis e resistentes a drogas (LOCKYER *et al.*, 2003; McCUTCHAN *et al.*, 1984; JOHNSTON *et al.*, 1993; McMANUS & HOPE, 1993; ALI *et al.*, 1991; DESPRES *et al.*, 1992).

Várias outras seqüências de DNA repetitivo foram descritas em *S. mansoni*. Algumas estão presentes somente em fêmeas, localizando-se no cromossomo W (SPOTILA *et al.*, 1987; WEBSTER *et al.*, 1989; SPOTILA *et al.*, 1989; GASSER *et*

al., 1991; DREW & BRINDLEY, 1995). A seqüência repetitiva de W1 consiste de uma seqüência degenerada de 476 pb e pode estar presente em até mais de 500 cópias no cromossomo W, foi utilizada como sonda (WEBSTER *et al.*, 1989) e posteriormente, como alvo para PCR (DIAS-NETO *et al.*, 1993a), na sexagem de cercárias.

Seqüências repetitivas, distribuídas de maneira dispersa ou em arranjos pelo genoma, foram encontradas como parte da estrutura de RNA mensageiro (mRNA), sendo até mesmo traduzidas em proteínas (SPOTILA *et al.*, 1991; SMITH *et al.*, 1992). Uma delas é o elemento repetitivo polimórfico (PRE) de 62 pb que está presente em transcritos de vários tamanhos em vermes adultos. Um destes mRNAs corresponde ao gene SM 750. O transcrito maduro possui na sua extremidade 3', anterior à cauda poli A, cinco cópias diretas do PRE, sendo que parte da primeira repetição está contida dentro da única janela de leitura aberta (ORF), composta de 57 aminoácidos (SPOTILA *et al.*, 1991). Curiosamente, um minissatélite polimórfico encontrado no DNA mitocondrial (mtDNA) de 558 pb do parasito possui algumas regiões idênticas à SM 750, carregando inclusive várias cópias em tandem do PRE. O significado desse achado ainda é desconhecido, mas foi sugerida uma possível transferência desta seqüência do núcleo para a mitocôndria (PENA *et al.*, 1995).

Dados mais atuais referentes ao genoma do *S. mansoni* podem ser encontrados na página do "Schistosome Genome Network" www.nhm.ac.uk/hosted_sites/schisto.

1.6 Diversidade gênica em *S. mansoni*

A variabilidade genética do *S. mansoni* foi inicialmente avaliada através da análise eletroforética de isoenzimas. FLETCHER *et al.* (1981c) realizaram estudos com cepas de *S. mansoni* que apresentavam diferenças em relação ao nível de infectividade em moluscos *B. glabrata*, observando que 3 dos 18 *loci* mostravam-se polimórficos, sem, entretanto, conseguir determinar uma clara correlação entre infectividade e polimorfismo isoenzimático. NAVARRO *et al.* (1992) utilizaram a mesma técnica para o estudo de cepas de diferentes regiões (Venezuela e Brasil), observando diferenças entre as cepas. Porém, quando analisaram vermes individuais de cada cepa, todos os *locus* demonstraram ser monomórficos dentro de uma mesma cepa. Resultados semelhantes, utilizando a mesma técnica, também

foram encontrados por FLETCHER *et al.* (1981a,b) e LoVERDE *et al.* (1985a,b) estudando populações de regiões distintas.

A técnica de “Southern blotting” foi a primeira técnica de análise molecular do genoma de esquistossomos. A utilização de sondas de RNA ribossomal (rRNA), hibridadas ao DNA genômico previamente digerido com enzimas de restrição, foi descrita para a distinção de espécies e cepas deste parasito (SIMPSON *et al.*, 1984; McCUTCHAN *et al.*, 1984; VAN KEULEN *et al.*, 1985). Marcadores moleculares detectáveis como polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (Restriction Fragments Length Polymorphisms – RFLP) com uma sonda de gene ribossomal, foram correlacionados com o surgimento de resistência ao quimioterápico hancantone em *S. mansoni* (BRINDLEY *et al.*, 1991), o que, não foi encontrado por Vieira *et al.* (1991), em relação à resistência ao quimioterápico oxaminiquina, quando utilizada a mesma técnica.

O surgimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) na década de 1980, desenvolvida por SAIKI *et al.* (1985) e MULLIS & FALOONA, 1987, permitindo a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, tornou-se uma ferramenta extremamente atrativa nos estudos de variabilidade genética. Resultados obtidos após a análise de diferentes cepas de *S. mansoni* utilizando iniciadores aleatórios na PCR em AP-PCR (DIAS-NETO *et al.*, 1993b,c) confirmaram os achados obtidos por técnicas como eletroforese de isoenzimas ou uso de sondas de rRNA (SIMPSON *et al.*, 1984; VAN KEULEN *et al.*, 1985; VIEIRA *et al.*, 1991). Os perfis de DNA obtidos mostraram a existência de um alto grau de similaridade genômica entre todas as cepas utilizadas no estudo. BARRAL *et al.* (1993), utilizando esta técnica com populações que foram isoladas de regiões geograficamente distantes como o Brasil e a África, e mantidas por diferentes intervalos de tempo em laboratório, mostraram um alto grau de similaridade entre as cepas estudadas, encontrando apenas 5% de polimorfismo entre as mais de 300 bandas obtidas através de 50 iniciadores.

Segundo DESPRES *et al.* (1991,1992) e LE *et al.* (2000), outra abordagem promissora para estudos de variabilidade, seria a análise de polimorfismos de tamanho de regiões do DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA apresenta uma taxa de divergência 3 a 5 vezes maior que o DNA genômico (BROWN *et al.*, 1979; AQUADRO & GREENBERG, 1983; HARRISON *et al.*, 1989), e em *S. mansoni* mostrou variabilidade entre diferentes clones de uma mesma cepa (PENA *et al.*,

1995). Um fator limitante para as análises feitas com mtDNA, é que ele não expressa diploidia e tampouco herança do tipo mendeliana não sendo, portanto aplicável a outros tipos de estudos populacionais, não servindo para estudos de ligação e também sem aplicabilidade para estudos em outras espécies do gênero (JANNOTTI-PASSOS *et al.*, 1997).

1.7 Microssatélites na análise populacional

No fim dos anos 80, os microssatélites, também chamados de SSR (Simple Sequence Repeats – Repetições de Seqüências Simples), foram isolados e descritos simultaneamente por três grupos de cientistas, como pequenas seqüências com 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem (LITT & LUTY, 1989; WEBER & MAY, 1989; TAUTZ, 1989), figura 4.

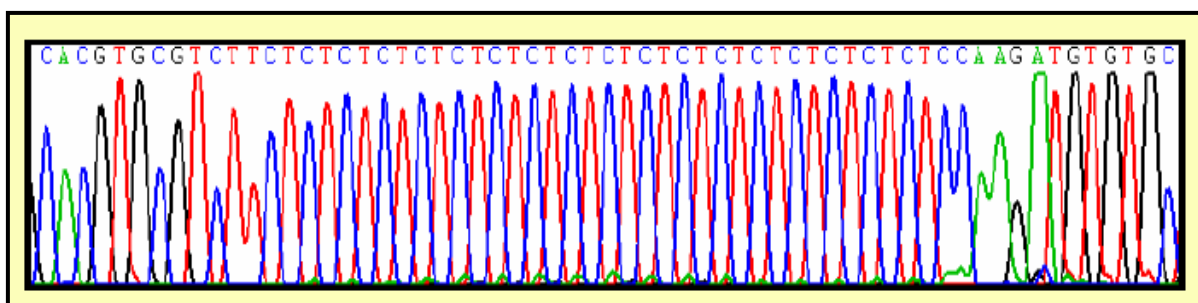


Fig. 4: Microssatélite com repetições em tandem de dinucleotídeos CT.

Os microssatélites foram classificados por WEBER (1990) como **perfeitos**, quando existe um motivo único de repetição, sem interrupções, **imperfeitos**, quando existem bases diferentes intercaladas na seqüência que se repete e **compostos**, quando uma repetição perfeita ou imperfeita está associada à outra repetição com um motivo diferente. Um estudo realizado com 100 *loci* de repetições (CA)_n demonstrou uma freqüência baixa de microssatélites com um número de repetições maior que 24 e que as repetições perfeitas predominam (64%), enquanto que as compostas são relativamente infreqüentes (11%) (WEBER, 1990).

Os microssatélites têm sido detectados dentro dos genomas de todos os organismos até agora analisados (HANCOCK, 1999), principalmente no interior de regiões não codificantes do genoma. Pode ser também encontrado numa taxa menor em seqüências de regiões promotoras codificantes, como a região promotora do gene *Drosophila Ubx* (BIGGIN & TJIAN, 1988), sítios de ligação para várias

proteínas regulatórias (LUE *et al.*, 1989; CSINK & HENIKOFF, 1998), como por exemplo, ligação de poli (GA)-poli(GT)- proteína em fibroblastos humanos (AHARONI *et al.*, 1993).

Em genomas de eucariotos estas seqüências são muito mais freqüentes do que em procariotos e melhor distribuídas ao acaso no genoma. Apresentam tamanhos mais variantes, formando *loci* genéticos muito mais polimórficos (HAMADA *et al.*, 1982). Nos procariotos as quantidades de seqüências repetidas em tandem são muito baixas (HANCOCK, 1995; FIELD & WILLS, 1998).

A maioria dos microssatélites (48-67%) encontrados em muitas espécies estudadas são dinucleotídeos (WANG *et al.*, 1994; SCHUG *et al.*, 1998) No genoma humano, dentre todas as seqüências repetitivas em tandem (mono a hexanucleotídeos), o poli A/T é o mais comum (BECKMANN & WEBER, 1992; STALLINGS 1992; TÓTH *et al.*, 2000; WREN *et al.*, 2000). Das repetições dinucleotídeos, a mais freqüente é AC, que ocorre duas vezes mais que repetições do tipo AT e três vezes mais que repetições AG (BECKMANN & WEBER, 1992). Os procariotos têm poucos microssatélites quando comparados com o genoma de eucariotos e possuem repetições do tipo poli A/T em sua maioria, seguidas das repetições AT (BELKUM *et al.*, 1998; GUR-ARIE *et al.*, 2000).

O polimorfismo e a ampla distribuição genômica fazem dos microssatélites um dos marcadores genéticos mais úteis disponíveis para caracterização de indivíduos (HAGELBERG *et al.*, 1992) ou para estudos populacionais (JARNE & LAGODA, 1996) e para a construção de mapas genéticos a fim de identificar *loci* envolvidos em doenças genéticas (DIETRICH *et al.*, 1996). Microssatélites podem ser facilmente classificados com o uso da PCR resultando em alelos bem definidos (ASHLEY & DOW, 1994). Como se cogita que os microssatélites ocorram em todos os organismos eucarióticos é razoável esperar que eles possam ter um papel importante no estudo da genética populacional de parasitos (CURTIS & MINCHELLA, 2000; BARKER, 2002).

Embora seja um marcador molecular de grande aplicação nos estudos acima mencionados, alguns problemas quanto ao seu emprego precisam ser ponderados, como a não amplificação via PCR de alelos devido a mutações nos sítios de ligação dos iniciadores (CALLEN *et al.*, 1993; BEAUMONT & BRUFORD, 1999); ao fato da *Taq* polimerase poder gerar produtos com um número de repetições diferente do número presente nas fitas moldes (BEAUMONT &

BRUFORD, 1999); e à dificuldade em se identificar e caracterizar microssatélites em algumas espécies (BEAUMONT & BRUFORD, 1999).

O “deslizamento” da DNA polimerase durante a replicação do DNA é tido como a principal causa da variação no número de repetições nesses *loci*, como foi demonstrado *in vivo* por SCHLÖTTERER & TAUTZ (1992), caracterizando a alta taxa de mutação (10^{-2} a 10^{-6} eventos por *locus* por geração) destas regiões repetidas quando comparadas com as regiões codificantes. Alguns destes erros são corrigidos pela atividade das exonucleases que revisam e reparam o DNA, mas outros escapam de serem corrigidos, tornando-se mutações. Os diferentes números de repetições caracterizam os diferentes alelos que podem ser detectados via eletroforese utilizando-se géis de poliacrilamida ou agarose especial de alta resolução.

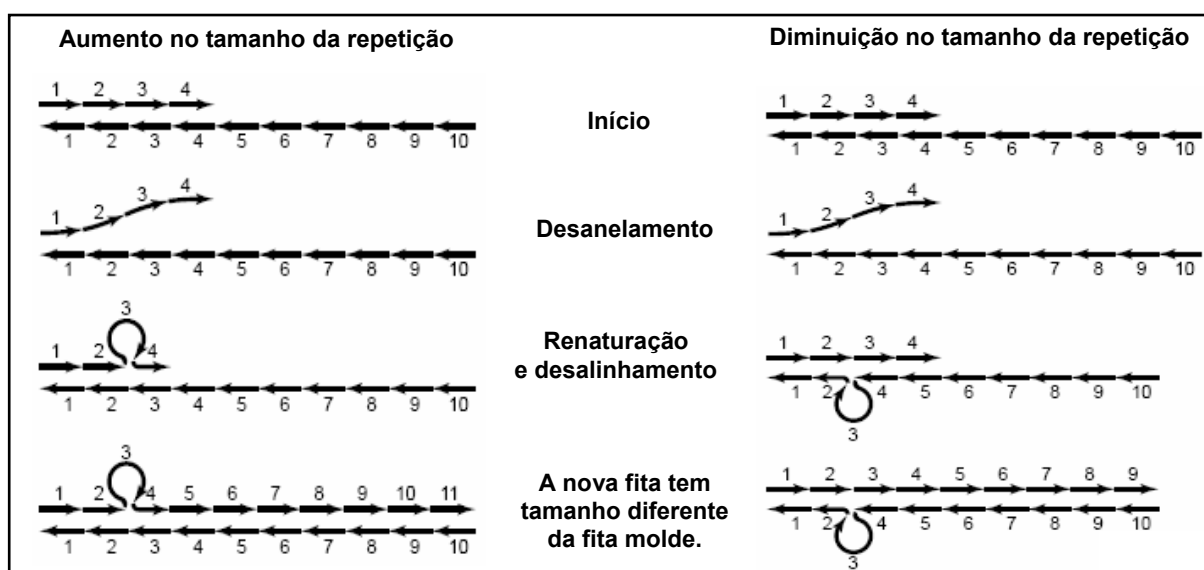


Fig. 5: Representação esquemática do deslizamento das fitas do DNA durante a replicação (ELLEGEN, 2000).

Durante a replicação as fitas de DNA podem se desanelar e se anelar novamente em locais errados formando alças, figura 5. Em consequência, após o reanelamento, se a alça formada estiver na fita molde do DNA, haverá uma contração do microssatélite com redução no número de repetições. Por outro lado, se esta alça estiver na fita que estiver sendo formada, haverá uma expansão do microssatélite com o aumento no número de repetições, (ELLEGEN, 2004).

1.8 Microssatélites na parasitologia

Na parasitologia, os microssatélites têm sido descritos e já foram empregados em diversos parasitos, tanto humanos como de outros animais. Na parasitologia humana podemos citar a identificação de microssatélites em diferentes espécies do gênero *Plasmodium* (BELKUM *et al.*, 1992) com especial referência à espécie *Plasmodium falciparum*, parasito responsável por malária em humanos (SU & WELLEMS, 1996). Citamos ainda a descrição de microssatélites em tripanossomatídeos como *Trypanosoma cruzi*, parasito causador da doença de Chagas (OLIVEIRA *et al.*, 1998) e *Leishmania* spp (ROSSI *et al.*, 1994; RODRIGUEZ *et al.*, 1997; RUSSEL *et al.*, 1999). No campo da parasitologia animal podemos citar a identificação de microssatélites em *Trichinella pseudospiralis*, parasito de aves e mamíferos (ZARLENGA *et al.*, 1996) e *Haemonchus contortus*, parasito gastrointestinal de ovinos e caprinos (HOEKSTRA *et al.*, 1997), dentre outros parasitos.

Os primeiros marcadores microssatélite para *S. mansoni* foram desenvolvidos por DURAND *et al.* (2000). Os autores descreveram 33 marcadores de microssatélite de *S. mansoni* ao procurarem em uma biblioteca e um banco de dados. Estes marcadores detectaram uma considerável variabilidade nos parasitos obtidos de ratos selvagens em Guadalupe. Além desse achado, uma estrutura genética sexo-específico da população foi inesperadamente observada (PRUGNOLLE *et al.*, 2002). BLAIR *et al.* (2001) desenvolveram outros 20 marcadores para *S. mansoni* e verificaram que a população africana era mais diversa do que outra relatada por DURAND *et al.* (2000) em Guadalupe. Em uma busca no banco de dados, RODRIGUES *et al.* (2002a) desenvolveram outros seis marcadores. Usando estes *loci*, RODRIGUES *et al.* (2002a) observaram que as populações de campo estudadas eram mais diversas que uma cepa de laboratório, mas não significativamente distintas umas das outras, apontando à ocorrência de um alto fluxo gênico no campo. Uma procura completa de todo o banco de dados da NCBI além das bibliotecas de seqüenciamento genômico enriquecidas com microssatélites aumentaram o número de *loci* identificados (RODRIGUES *et al.* 2002b). O alto conteúdo de AT (65%) relatado para o genoma de *S. mansoni* foi refletido nas classes de repetições identificadas (SIMPSON *et al.*, 1982; MARX *et al.*, 2000).

2 JUSTIFICATIVA

A identificação do foco de transmissão ativa de esquistossomose em Esteio representa uma oportunidade epidemiológica: a de investigar e monitorar esta infecção em sua fase inicial de instalação, com a possibilidade até mesmo da erradicação do foco ou, pelo menos, de eficaz controle. Outro aspecto de relevância é o caráter de baixa endemicidade do foco; próprio de uma área de introdução recente do parasito, trazendo dificuldades para o diagnóstico e monitoramento da infecção, tanto em hospedeiros vertebrados como em hospedeiros invertebrados (GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*, 2004).

Sua elevada frequência na população de muitas regiões e o déficit orgânico que acarreta para considerável número de indivíduos, comprometendo o desenvolvimento dos jovens e a produtividade dos adultos, ou conduzindo os pacientes com formas hepatosplênicas a um estado de dependência que pesa sensivelmente na economia doméstica ou da coletividade, justificam os esforços que se fazem para conhecê-la melhor e para encontrar soluções adequadas (REY, 2002).

Diversos estudos demonstram diferenças significativas no fenótipo, tanto em populações intra quanto inter-geográficas de *S. mansoni*. Cepas provenientes do mesmo ou de diferentes regiões geográficas demonstraram diferenças na produção de ovos (KASSIM *et al.*, 1979), infecção em moluscos (RICHARDS & SHADE, 1987), manifestações clínicas da doença e a infectividade em humanos (IMBERT-ESTABLET & COMBES, 1986; WHO, 1993), e suscetibilidade a drogas (ARAÚJO *et al.*, 1980; DIAS *et al.*, 1982).

A análise do DNA permite um estudo direto do genoma do parasito. Diferenças inter e intra-específicas nas seqüências de DNA têm sido observadas pela análise do rDNA por RFLP (McCUTCHAN *et al.*, 1984; SIMPSON *et al.*, 1984; WALKER *et al.*, 1986 e 1989; VIEIRA *et al.*, 1991). Análises utilizando RAPD têm demonstrado considerável diferenciação molecular entre espécies de *Schistosoma* (DIAS-NETO *et al.*, 1993b; KAUKAS *et al.*, 1994, MONÉ *et al.*, 2003) e apresenta sutis variações genéticas entre cepas obtidas de diferentes continentes (BARRAL *et al.*, 1993; DIAS-NETO, 1993b,c).

O uso de marcadores microssatélites na análise populacional apresenta várias qualidades, incluindo codominância, alelismo, herança mendeliana e

variabilidade, além do prévio conhecimento de sua localização dentro do genoma. Os microssatélites possuem a capacidade de analisar diversos *loci* em único estudo.

Embora o número de *loci* de microssatélites polimórficos descrito ainda seja pequeno, os estudos mencionados anteriormente, conclusivamente demonstram a utilidade de marcadores de microssatélites polimórficos para estudos genéticos e populacionais dos esquistossomos. O uso destes marcadores ajudará na compreensão da dinâmica populacional em áreas endêmicas ou de recente introdução.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o *S. mansoni* isolado do foco em Esteio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sobre os isolados Esteio e JV de *S. mansoni*:

- Caracterizar morfológicamente o trematódeo;
- Verificar se há diferença entre os dois isolados, tanto morfológicamente como molecularmente, utilizando marcadores microssatélites;
- Determinar a diferença, com o uso de microssatélites, entre cepas mantidas em laboratório, LE e MAP, e os isolados de campo JV e Esteio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os isolados Esteio e JV do foco de transmissão em Esteio têm sido mantidos em camundongos Swiss. Os moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório para manutenção do ciclo são infectados com 10 miracídios cada, provenientes das fezes de roedores infectados e, após 4-5 semanas, são expostos à luz artificial por no mínimo 3 horas para liberação de cercárias. As cercárias coletadas, em torno de 100, são usadas para infectar os roedores por via subcutânea. Um lote de camundongos é utilizado para manutenção do ciclo e o outro, após 45 dias, é sacrificado e os vermes coletados manualmente do sistema porta-hepático.

O município de Esteio (aproximadamente 29°50' S para 29°54' S e 51°12' para 51°10' W) está localizado a 15 quilômetros de Porto Alegre e possui uma área territorial de 27,60 quilômetros quadrados. Tem uma altitude média de 29 metros e possui uma área total de 32,5 quilômetros quadrados. Esteio possui acesso privilegiado, por via rodoviária através da BR 116 e da RS 118, por via ferroviária, através do metrô de superfície e por via fluvial, pelo Rio dos Sinos.

De acordo com a estimativa do IBGE do ano de 2003, o município de Esteio dispõe de uma população de 82.972 habitantes. A população de 0 a 14 anos é de aproximadamente 21.597 habitantes e o restante da população apresenta idade superior.

Cinco inquéritos coproscópicos foram realizados em Esteio, em outubro de 1997, setembro de 1998, dezembro de 1999, maio e outubro de 2000. Pelo fato de que a maioria dos infectados possuía menos de 1 ovo por grama de fezes, foi feita a proposta de classificar este foco como de ultra-baixa endemicidade (GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*,2004).

4.1 Análise morfológica dos vermes

4.1.1 Coloração

Os vermes coletados foram separados sexualmente com o auxílio de dois pincéis pequenos e colocados entre lâmina e lamínula de vidro, fixados em solução álcool-formol-acético (A.F.A). Após a fixação dos vermes, eles foram corados pelo

carmim clorídrico alcoólico por 5 minutos, lavados em álcool 70%, colocados em álcool 90% por 5 minutos e álcool 100% por 10 minutos. Diafanizados em Creosoto de Faia por 5 minutos e em seqüência passados em placa de Petri, contendo Creosoto mais Bálsamo do Canadá na concentração de 3:1, 1:1 e 1:3, para ser feita a montagem da lâmina em Bálsamo do Canadá e analisada a morfologia dos vermes (KASTNER *et al.*, 1975; KOHN *et al.*, 1979a,b,1987; ARAÚJO *et al.*, 1991).

4.1.2 Morfometria

Os exemplares fixados foram analisados em microscópio óptico com câmera acoplada. Foi utilizado o microscópio Axiolab MC 80 DX, marca Zeiss, com ocular milimetrada, devidamente calibrada.

Foram examinados 51 exemplares machos e 47 fêmeas do isolado Esteio, enquanto do isolado JV examinou-se 59 machos e 38 fêmeas. Os caracteres analisados nos exemplares machos para os lobos testiculares foram: o número, comprimento e largura. Nos exemplares fêmeas o comprimento e largura máxima do ovário e ovo uterino, do espinho apenas o comprimento. Em ambos os sexos mediram-se o comprimento total do corpo, das ventosas orais, ventrais e a distância entre a extremidade anterior da ventosa oral e extremidade anterior da ventosa ventral (distância entre ventosas) segundo KASTNER *et al.* (1975) e KOHN *et al.* (1979); foram mensuradas a largura para ambas as ventosas e largura máxima do corpo a nível testicular para o macho e ao nível do ovário para a fêmea.

4.2 Análise estatística dos dados morfológicos

Dos valores apresentados, para os isolados Esteio e JV, foram definidas suas médias com desvio padrão e será realizada uma análise de variância fator único (ANOVA). Valores de $p \leq 0,05$ serão considerados significativos.

4.3 Análise molecular

Para a análise molecular foram utilizados vermes adultos machos e fêmeas das cepas de laboratório LE e MAP. A cepa LE foi isolada de um paciente em Belo Horizonte em 1959 (PELLEGRINO *et al.*, 1967; ARAÚJO *et al.*, 1980; VALADARES *et al.*, 1981). A cepa MAP foi isolada de um paciente em Campinas-SP em 1977 (de SOUZA DIAS *et al.*, 1982), essa cepa mostrou-se resistente para oxaminiquine e hicantone, porém não para praziquantel e niridazol (de SOUZA DIAS *et al.*, 1982). Ambas as cepas vem sendo mantidas no laboratório de Malacologia CPqRR/FIOCRUZ.

Utilizou-se para análise molecular 20 vermes de cada sexo das cepas LE, MAP e do isolado Esteio, da geração F3; do isolado JV, geração P, foram utilizados 27 vermes machos e 14 fêmeas.

4.4 Extração de DNA

Vermes individuais foram colocados em microtubos de 0,5 mL e submersos em nitrogênio líquido por alguns segundos, imediatamente após, transferidos para um recipiente com água fervente para destruir o tegumento. Os vermes individuais foram digeridos em um tampão de extração composto de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl e 0,5% de SDS, com 100 µg/mL de proteinase K, por 16 horas a 56°C. A enzima foi desativada a 95°C por 10 minutos, acrescentou-se ao produto da digestão acetato de sódio 3 M pH 5,2 e etanol absoluto resfriado. Os tubos foram colocados em temperatura de -70°C por 1 hora. Centrifugou-se por 10 minutos em micro-centrifuga a 14.000 rpm em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado 2 vezes com etanol 70° resfriado, centrifugado a frio por 10 minutos na velocidade de 14.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e, após evaporar o etanol, o sedimento foi ressuspendido em TE e reidratado overnight a 4°C.

A concentração de DNA foi determinada por leitura espectrofotométrica no aparelho BioPhotometer (Eppendorf) a 260 nm, sendo a qualidade de DNA determinada pela relação da absorbância: A 260/280 nm.

4.5 Análise de microssatélites

Os microssatélites utilizados estão descritos no GenBank com os seguintes códigos de acesso: L25065, AF009659, AF325694 e AF325695, observar a tabela 1.

Tabela 1 – Lista das seqüências de *Schistosoma mansoni* contendo os microssatélites utilizados no trabalho, n° de acesso no banco de dados, repetições e classificação das repetições.

Acesso	Repetição	Classificação
L25065	(ATT) ₇	Perfeita
AF009659	(CTT) ₁₀	Perfeita
AF325694	(ATT) ₁₁	Perfeita
AF325695	(TAGA) ₇	Perfeita

4.6 Iniciadores para PCR de microssatélites

Os iniciadores utilizados para a análise dos indivíduos foram desenhados utilizando-se o programa de computador OLIGO[®] versão 3.3 (Molecular Biology Insights – Cascade, USA), seguindo os seguintes parâmetros: o tamanho esperado para cada fragmento gerado na PCR dos diferentes microssatélites não poderia sobrepor o outro. Assim o tamanho dos produtos deveria estar situado entre 150 pb e 500 pb, possibilitando a análise simultânea de mais de um fragmento. O tamanho dos iniciadores deveria estar entre 18 e 22 nucleotídeos, com as temperaturas de anelamento entre 58°C e 60°C. Os iniciadores não poderiam apresentar complementaridade principalmente nas suas extremidades 3' ou com os outros iniciadores.

Os iniciadores foram sintetizados pela Life Technologies (Gaithersburg, USA) e Bio.Synthesis (Lewisville, USA), sendo que um dos iniciadores de cada par foi marcado em sua porção 5' com fluoresceína, permitindo seu uso em análises no seqüenciador automático de DNA, A.L.F. – Automatic Laser Fluorescence (Pharmacia-LKB), com o programa ALF Fragment Manager, a seqüência dos iniciadores está descrita na tabela 2.

Tabela 2 – Seqüências dos iniciadores, temperaturas de anelamento e número das seqüências com *loci* de microssatélites estudados.

Iniciadores	Seqüência 5'→3'	TA	Acesso
SmBr5-F	GAA TTA CTG TCC CTT TAT CTC	58°C	L25065
SmBr5-R	F-AAA CTA TTC ATT ACT GTC GGG		
SmBr6-F	CTT AAC AGA CAT ACA CGC	58°C	AF009659
SmBr6-R	F-GAA TAC AGG CTA TAA TCT ACA		
1TTA-F	ATT GGC GTC AGT AGA AGA GA	60°C	AF325694
1TTA-R	F-ATT CAC CCA TTG TCT TAA AAC C		
13TAGA-F	ACA GCA CCC GTC CGG AGG	60°C	AF325695
13TAGA-R	F-TTA AAA TTC ATT CGA ACT GAA G		

TA – temperatura de anelamento

Acesso – número de acesso das seqüências no GenBank™.

F- Fluoresceína

Os iniciadores para os *loci* SmBr5 e SmBr6 foram utilizados por RODRIGUES *et al.* (2002a) e fazem parte de duas etiquetas de seqüência transcritas (EST) e são elas uma proteína transportadora de glicose e a porção final 3' de uma proteína c-GMP dependente, respectivamente.

Os outros dois iniciadores, 1TTA e 13TAGA, foram construídos a partir do DNA genômico, não estando localizado em uma região codificante (CURTIS *et al.*,2001).

4.7 PCR de microssatélites

Os iniciadores foram usados em amplificações por PCR de fragmentos de DNA de vermes adultos individuais de diferentes cepas. Nestas reações usamos 2 ng de DNA, 0,15 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima (1,5 mM de MgCl₂, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, KCl 50 mM), 10 pmoles de cada iniciador e 200 µM de dNTP, para um volume total de reação de 10 µL. A PCR foi realizada em termociclador Perkin Elmer – Gene Amp PCR System 2400, por 35 ciclos consistindo de 5 min a 95°C para desnaturação, 30 seg. de anelamento para os iniciadores na temperatura calculada para cada iniciador, 30 seg. a 72°C para

extensão, 30 seg. a 95°C para desnaturação, retornando por 34 vezes ao passo 2, finalizando com 30 seg. a 72°C e mantido a 4°C após o término da reação.

Após a PCR, 3 µL dos produtos de amplificação foram submetidos à análise em géis de poliacrilamida a 8%, utilizando-se como padrão de peso molecular ØX 174 RF DNA/*Hae* III Fragments (Invitrogen), fixados em 150 mL de solução de etanol a 10% (v/v) com 0,5% de ácido acético (v/v) e corados com nitrato de prata a 0,3%. Finalmente, os géis foram lavados em água deionizada e revelados em solução aquosa de hidróxido de sódio 3% (p/v) com 0,5% de formaldeído (v/v), até o aparecimento das bandas (SANGUINETTI *et al.*, 1994).

4.8 Determinação do tamanho dos alelos de microssatélites

O tamanho esperado dos alelos varia conforme o iniciador usado. Para o microssatélite SmBr5 o tamanho é de aproximadamente 331pb, o microssatélite SmBr6 fica na faixa de 241pb (RODRIGUES *et al.*, 2002a). Os microssatélites 1TTA e 13TAGA apresentam valores próximos a 155pb e 458pb, respectivamente.

Para determinação exata do tamanho dos alelos dos microssatélites amplificados, 1µL do produto da PCR foi desnaturado a 95°C por 5 min, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante com 7M de uréia, utilizando-se tampão de corrida TBE 0,6X (1M de Tris, 0,83 M de ácido bórico e 10 mM de EDTA) em seqüenciador automático de DNA A.L.F. – Automatic Laser Fluorescence (Pharmacia-LKB) por 4 horas. Também foram aplicados no gel 10 fmoles de um padrão de peso molecular fluorescente de 50-500 pb (Pharmacia) como referência de mobilidade dos fragmentos. Esta metodologia permite a análise simultânea de até 35 amostras em cada corrida. Os resultados obtidos foram analisados com os programas ALF Fragment Manager e Allele Link (Pharmacia).

4.9 Análise dos dados obtidos com microssatélites: parâmetros de genética de populações

A variação genética e a estrutura genética das populações de *S. mansoni* foram analisadas baseando-se nos dados obtidos com as amplificações dos microssatélites.

Os estudos genéticos foram feitos utilizando-se o software ARLEQUIN versão 2.000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Os dados de tamanho de alelo/*locus*/indivíduo, depois de tabulados, foram lançados no programa. Primeiramente, o programa traz um resumo das informações referentes aos tipos de dados analisados e as análises realizadas com seus devidos graus de acuidade, além do resultado do cálculo, mostrado abaixo:

- Nome da população (amostra) estudada
- Índices de diversidade como:
- N° total de alelos que diz respeito à combinação em um ou mais *loci*.
- N° total de *loci* e o n° de *loci* polimórficos na amostra e a heterozigose esperada para aquela amostra segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- Lista dos diferentes alelos de cada *locus* com suas respectivas freqüências.
- O teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg mostra uma tabela com os *loci*, o n° de indivíduos analisados em cada um e os valores observados e esperados de heterozigose para cada um, bem como valores para o teste exato das probabilidades (P) e do desvio padrão.

Cada um dos testes implementados pelo programa é seguido das respectivas referências bibliográficas.

Para cada *locus* calculou-se o número de alelos, as freqüências alélicas observadas, as freqüências genotípicas observadas e esperadas. Os valores da heterozigose observada e esperada dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados.

No estudo interpopulacional, calculou-se um índice de fixação (F_{ST}) (WRIGHT, 1921) entre todas as possíveis combinações de populações par a par, estimando-se assim, as distâncias entre elas com relação à freqüência dos alelos em cada população. Este índice reflete a divergência genética entre subpopulações e é um dos principais índices em genética de populações para determinar grau de estruturação destas populações. Como o cálculo de F_{ST} tem como pressupostos, baixas taxas de mutação para os *loci* estudados, e que excessos de similaridade entre as populações se devam a migrações (SLATKIN, 1995), calculamos então o índice R_{ST} , análogo ao índice de fixação que leva em consideração as maiores taxas de mutação encontradas em *loci* de microssatélites, além de características próprias das mutações nestes *loci* (SLATKIN, 1995).

5 RESULTADOS

5.1 MORFOLOGIA

As mensurações realizadas nos espécimes do isolado Esteio serão apresentados a seguir, na tabela 3, com os valores mínimos e máximos para os caracteres, assim como a média e o desvio padrão para cada medida.

Tabela 3: Valores mínimos e máximos, médios e desvio padrão em milímetros das mensurações realizadas em machos e fêmeas através de microscopia óptica do Isolado Esteio. O n° de lobos está representado em unidades.

Caracteres	Mínimo / Máximo		Macho (n=51)	Mínimo / Máximo		Fêmea (n=47)
Comprimento	2,09	9,21	5,88 ± 1,78	5,01	9,42	6,96 ± 1,13
Largura ao nível da medida	0,22	0,38	0,31 ± 0,03	0,08	0,24	0,14 ± 0,02
Comprimento da ventosa oral	0,10	0,21	0,14 ± 0,02	0,02	0,08	0,05 ± 0,01
Largura da ventosa oral	0,09	0,25	0,15 ± 0,04	0,03	0,06	0,04 ± 0,01
Comprimento do acetábulo	0,10	0,24	0,17 ± 0,03	0,02	0,05	0,03 ± 0,01
Largura do acetábulo	0,06	0,40	0,15 ± 0,07	0,02	0,06	0,04 ± 0,01
Distância entre ventosas	0,20	0,47	0,31 ± 0,07	0,09	0,24	0,15 ± 0,03
Número de lobos testiculares	7	11	8,17 ± 0,92		*	*
Comprimento de cada lobo	0,06	0,12	0,08 ± 0,01		*	*
Largura de cada lobo	0,02	0,11	0,04 ± 0,01		*	*
Comprimento do ovário		*	*	0,17	0,41	0,24 ± 0,05
Largura do ovário		*	*	0,07	0,14	0,09 ± 0,01
Comprimento do ovo		*	*	0,08	0,12	0,09 ± 0,01
Largura do ovo		*	*	0,02	0,05	0,03 ± 0,005
Comprimento do espinho		*	*	0,01	0,03	0,02 ± 0,004

*: Ausente

Os dados do isolado JV, nas mensurações realizadas, estão descritos na tabela 4. Os valores estão separados em mínimo e máximo, além das médias e desvio padrão para os espécimes analisados.

Tabela 4: Valores mínimos e máximos, médios e desvio padrão em milímetros das mensurações realizadas em machos e fêmeas através de microscopia óptica do Isolado JV. O n° de lobos está representado em unidades.

Caracteres	Mínimo / Máximo		Macho (n=59)	Mínimo / Máximo		Fêmea (n=38)
Comprimento	2,50	16,20	4,53 ± 1,83	3,11	7,01	5,00 ± 0,94
Largura ao nível da medida	0,12	0,49	0,28 ± 0,05	0,11	0,22	0,14 ± 0,02
Comprimento da ventosa oral	0,09	0,22	0,14 ± 0,03	0,02	0,07	0,05 ± 0,01
Largura da ventosa oral	0,10	0,22	0,15 ± 0,03	0,02	0,07	0,05 ± 0,01
Comprimento do acetábulo	0,06	0,23	0,15 ± 0,05	0,03	0,06	0,04 ± 0,01
Largura do acetábulo	0,06	0,30	0,14 ± 0,04	0,02	0,06	0,05 ± 0,01
Distância entre ventosas	0,09	0,45	0,29 ± 0,09	0,06	0,21	0,13 ± 0,03
Número de lobos testiculares	6	10	7,85 ± 1,08		*	*
Comprimento de cada lobo	0,03	0,10	0,07 ± 0,01		*	*
Largura de cada lobo	0,02	0,07	0,04 ± 0,01		*	*
Comprimento do ovário		*	*	0,04	0,38	0,22 ± 0,06
Largura do ovário		*	*	0,07	0,14	0,10 ± 0,01
Comprimento do ovo		*	*	0,07	0,11	0,09 ± 0,009
Largura do ovo		*	*	0,02	0,09	0,04 ± 0,01
Comprimento do espinho		*	*	0,01	0,02	0,01 ± 0,003

*: Ausente

O cálculo de análise de variância para os dois isolados demonstrou diferenças significativas, para $p < 0,05$, nos seguintes caracteres examinados: comprimento do verme macho e o comprimento de cada lobo testicular, para as fêmeas apenas o comprimento total do corpo revelou diferença significativa para os dois isolados.

A análise de variância fator único (ANOVA) comparando os dois isolados, Esteio e JV, estão representados nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Valor médio dos caracteres analisados em milímetros e análise de variância dos isolados Esteio e JV para vermes machos. Diferenças significativas para $p < 0,05$.

Caracteres	Macho Esteio	Macho JV	Valor de p
Comprimento	5,88	4,53	$p < 0,05$
Largura ao nível da medida	0,31	0,28	NS
Comprimento da ventosa oral	0,14	0,14	NS
Largura da ventosa oral	0,15	0,15	NS
Comprimento do acetábulo	0,17	0,15	NS
Largura do acetábulo	0,15	0,14	NS
Distância entre ventosas	0,31	0,29	NS
Número de lobos testiculares	8,17	7,85	NS
Comprimento de cada lobo	0,08	0,07	$p < 0,05$
Largura de cada lobo	0,04	0,04	NS

NS: não significante

Tabela 6: Valor médio dos caracteres analisados em milímetros e análise de variância dos isolados Esteio e JV para vermes fêmeas. Diferenças significativas para $p < 0,05$.

Caracteres	Fêmea Esteio	Fêmea JV	Valor de p
Comprimento	6,96	5,00	$p < 0,05$
Largura ao nível da medida	0,14	0,14	NS
Comprimento da ventosa oral	0,05	0,05	NS
Largura da ventosa oral	0,04	0,05	NS
Comprimento do acetábulo	0,03	0,04	NS
Largura do acetábulo	0,04	0,05	NS
Distância entre ventosas	0,01	0,13	NS
Comprimento do ovário	0,24	0,22	NS
Largura do ovário	0,09	0,10	NS
Comprimento do ovo	0,09	0,09	NS
Largura do ovo	0,03	0,04	NS
Comprimento do espinho	0,02	0,01	NS

NS: não significante

5.2 Análise com microssatélites – Isolados Esteio e JV

Os dados relativos ao tamanho de alelos/*locus*/indivíduo foram lançados no programa Arlequin 2.000 e foram feitas análises de freqüências dos alelos de cada *locus* e os testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg *locus a locus*. Os resultados obtidos com os dois isolados, Esteio e JV, e as cepas de laboratório LE e MAP estão sumariados a seguir, na tabela 7.

Tabela 7: Número de alelos, heterosigozidade esperada (*He*) e observada (*Ho*) para cada *locus* examinado nos isolados de campo e cepas de laboratório.

Isolado/cepa	<i>Locus</i> SmBr5			<i>Locus</i> SmBr6			<i>Locus</i> 13TAGA			<i>Locus</i> 1TTA		
	Alelos (n=7)	<i>He</i>	<i>Ho</i>	Alelos (n=7)	<i>He</i>	<i>Ho</i>	Alelos (n=13)	<i>He</i>	<i>Ho</i>	Alelos (n=8)	<i>He</i>	<i>Ho</i>
Esteio	2	0,41	0,22	2	0,49	0,57	10	0,85	0,38	14	0,52	0,17
JV	2	0,51	0,53	3	0,58	0,68	11	0,75	0,34	5	0,58	0,57
LE	7	0,78	0,72	5	0,75	0,62	8	0,77	0,57	3	0,58	0,75
MAP	4	0,71	0,35	5	0,62	0,42	10	0,84	0,35	16	0,51	0,28

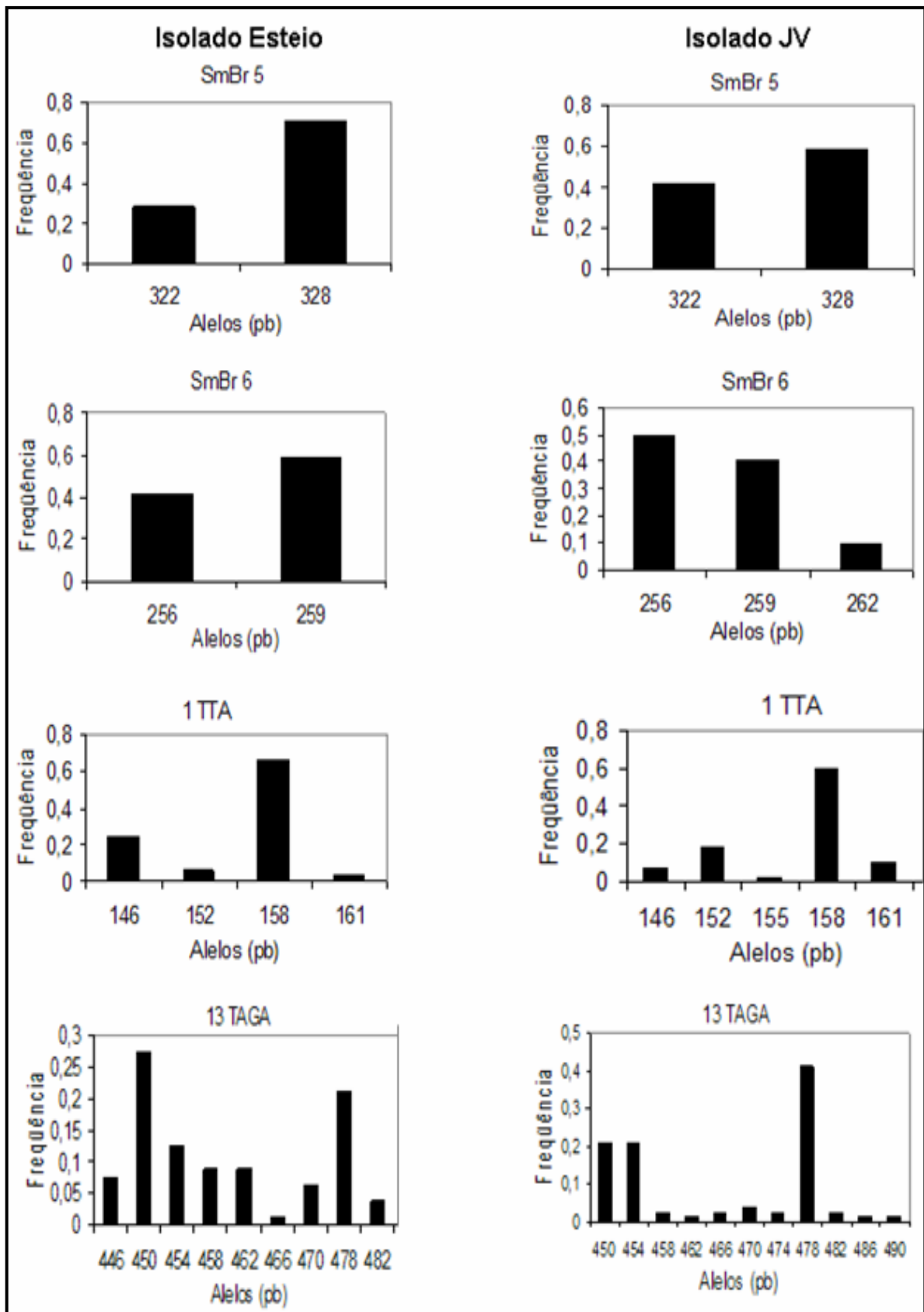


Fig. 6: Distribuição das frequências alélicas para os quatro *loci* dos isolados Esteio e JV.

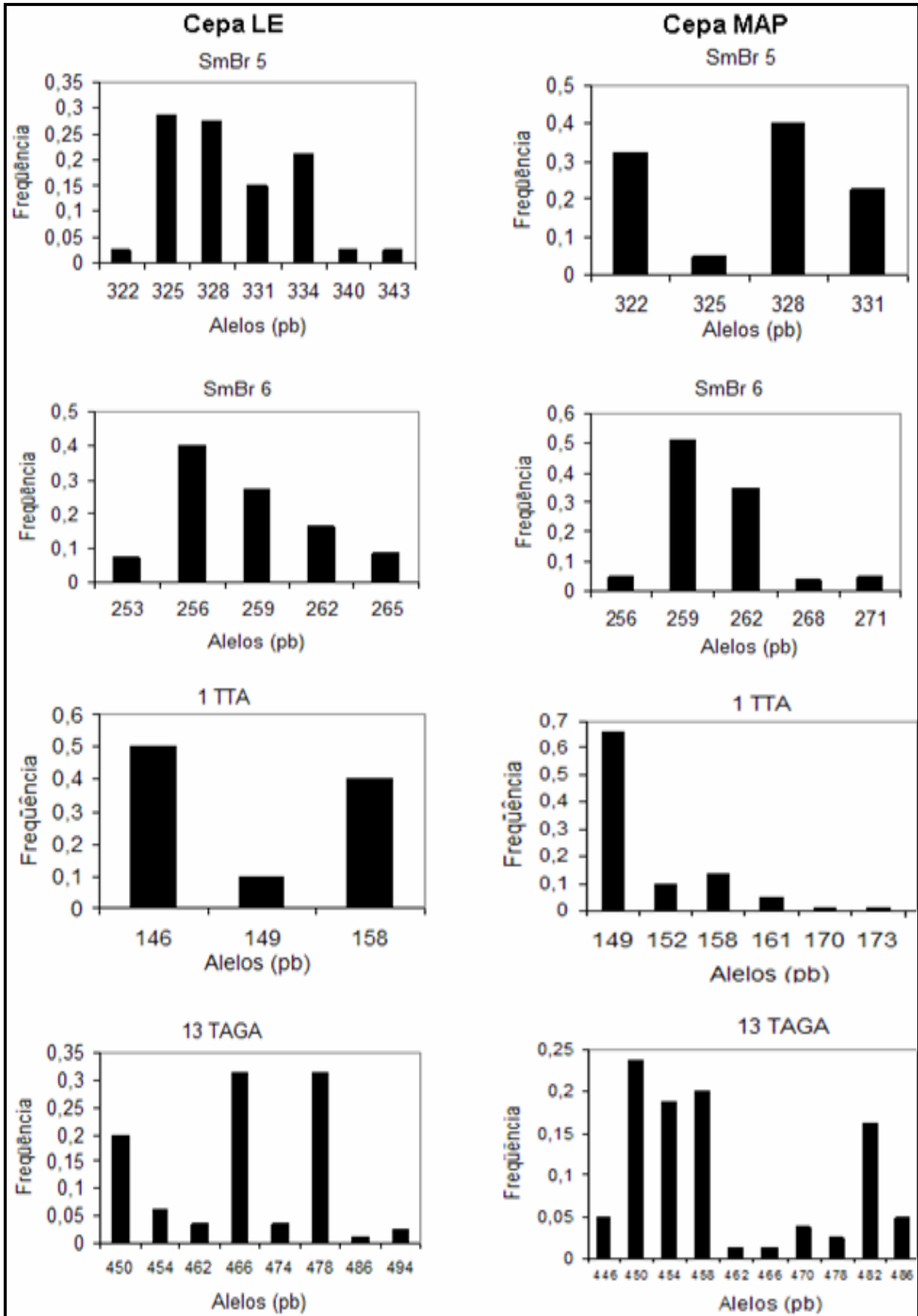


Fig. 7: Distribuição das frequências alélicas para os 4 *loci* das cepas LE e MAP.

5.3 Análise interpopulacional

A tabela 8 representa a matriz construída pelo programa Arlequin 2.000, utilizando o índice de fixação (F_{ST}), relativo às frequências dos alelos, para estimar as distâncias genéticas entre os pares das populações estudadas um a um.

Tabela 8: Estimativa das distâncias genéticas entre os pares das populações utilizando F_{ST} .

Populações	JV	Esteio	LE	MAP
JV	0,00000			
Esteio	0,03193	0,00000		
LE	0,12833	0,13088	0,00000	
MAP	0,19341	0,20198	0,19095	0,00000

A tabela 9 representa a matriz construída pelo programa Arlequin 2.000, utilizando R_{ST} (SLATKIN, 1995), relativo às frequências dos alelos, para estimar as distâncias genéticas entre os pares de populações uma a uma.

Tabela 9: Estimativa da distância genética entre os pares das populações utilizando R_{ST} .

Populações	JV	Esteio	LE	MAP
JV	0,00000			
Esteio	0,03299	0,00000		
LE	0,14722	0,15059	0,00000	
MAP	0,23979	0,25309	0,23602	0,00000

6 DISCUSSÃO

A presença de um foco de transmissão da parasitose no RS deu “status” ao Estado em possuir o foco mais meridional da América até o presente momento. A esquistossomose possui sua distribuição nos trópicos, sendo considerada uma doença tropical. O RS possui um clima subtropical com estações bem definidas. Entretanto, o parasito aqui se estabeleceu. Acredita-se que o grande fluxo rodoviário associado com a presença de indústrias de grande porte nas redondezas do foco inicial possa ser a maneira mais provável da introdução da esquistossomose no estado (GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*, 2004).

Como relatado anteriormente, o isolado Esteio é proveniente de caramujos naturalmente infectados e de fezes oriundas de dois pacientes. O isolado JV é de apenas um paciente infectado.

Devido às críticas para com a maneira do isolamento do parasito da natureza, realizaram-se medições para determinar se há diferença morfológica entre os parasitos. O comprimento total do corpo de ambos os sexos apresentou diferenças significativas. O comprimento de cada lobo testicular também apresentou diferença. Os outros caracteres mensurados não apresentaram diferenças. Esses dados parcialmente concordam com os descritos por MACHADO-SILVA *et al.* (1995) onde cepas simpátricas mostram pequenas variações morfológicas. Muitas vezes, essas pequenas diferenças significativas não vão além de um caractere estudado, sendo variações intra-específicas.

Inúmeros estudos morfológicos dos vermes adultos são usados para esclarecer questões taxonômicas (SAMBON, 1907; PIRAJÁ DA SILVA, 1908), detectar diferenças nos vermes recuperados de diferentes hospedeiros (KASTNER *et al.*, 1975; DIAS & PIEDRABUENA, 1980; MACHADO-SILVA *et al.*, 1994; NEVES *et al.*, 1998) e de parasitas provenientes de diferentes cepas (MAGALHÃES & CARVALHO, 1973; PARAENSE & CORRÊA, 1981; MACHADO-SILVA *et al.*, 1995).

Baseado nos estudos referidos foram feitas comparações com os dados obtidos pela análise dos isolados gaúchos.

Nos vermes machos de ambos os isolados, o comprimento total, o comprimento e largura da ventosa oral, o comprimento e largura do acetábulo e a distância entre as ventosas apresentaram valores abaixo da média e desvio padrão da bibliografia acima.

Nos vermes fêmeas houve diferenças dos isolados gaúchos com relação às cepas estudadas. O isolado Esteio apresentou valores abaixo da média e desvio padrão nos seguintes caracteres: comprimento e largura da ventosa oral, comprimento do acetábulo, comprimento do ovário e largura do ovo. O isolado JV, nas seguintes características: comprimento total do corpo, comprimento da ventosa oral, distância entre ventosas, comprimento do ovário e comprimento do espinho.

Embora tais características sejam menores que as relatadas em estudos anteriores, a plasticidade fenotípica do *S. mansoni* parece ser a explicação para tais variações (NEVES *et al.*, 2004). Organismos que vivem em ambientes com condições heterogêneas podem produzir diferentes fenótipos sob influência das variadas condições a que estão submetidos (POULIN, 1996).

No foco de transmissão de Esteio, o número de ovos encontrados por grama de fezes é muito baixo, em muitos casos inferiores a um ovo (GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*, 2004). Curiosamente, em um estudo recente, realizou-se uma possível associação do tamanho do parasito com o número de ovos nas fezes (MARTINEZ *et al.*, 2003).

Como os vermes dos isolados de Esteio se mostraram menores em comprimento e a carga de ovos nas fezes é baixa, esse poderia ser um dos motivos da baixa eliminação de ovos nas fezes por pacientes infectados em Esteio. Porém, em focos de baixa intensidade de transmissão o número de vermes machos encontrados é maior (D'ANDREA *et al.*, 2000). Assim sendo, um estudo com um casal de vermes poderia esclarecer se a redução de tamanho dos vermes afeta a oviposição e a migração para os locais de deposição dos ovos.

A análise, por microssatélites, dos isolados Esteio e JV, utilizando 4 *loci*, apresentou 17 e 21 alelos, enquanto as cepas de laboratório, LE e MAP, apresentaram 23 e 25 alelos, respectivamente. Não foi possível a determinação do tamanho de 4 alelos, 1 em cada isolado e 2 na cepa MAP devido a problemas operacionais. Eles poderiam representar a repetição de um alelo existente ou um novo alelo e para evitar qualquer problema eles foram ignorados na discussão.

Entre os dois isolados de campo houve uma pequena diferença nos alelos encontrados. O isolado Esteio apresentou apenas um alelo que não foi encontrado no isolado JV enquanto esse isolado apresentou 5 alelos. A estimativa de distância genética (F_{ST}) relativa ao número de diferentes alelos foi de aproximadamente 3,2%.

Ao analisarmos os *loci* SmBr5 e 6 verificamos a presença de 4 alelos para Esteio e 5 para JV, enquanto a cepa LE apresentou 12 alelos e a cepa MAP 9. Esses *loci* estão presentes em uma EST, porém não fazem parte da região codificadora da proteína. Espera-se que em regiões codificantes a pressão seletiva seja maior (RODRIGUES *et al.*, 2002a).

Com relação aos outros dois *loci* o mesmo não é observado. A presença de 13 alelos para Esteio, 16 para JV, 11 para cepa LE e 16 para MAP está de acordo como previsto por KOKOSKA *et al.*, 1998, onde em regiões não codificantes as pressões genéticas são reduzidas permitindo um aumento da variabilidade e da informatividade da seqüência repetitiva.

Em um estudo comparativo de populações de campo com cepas de laboratório utilizando 7 *loci* para microssatélites, STOHLER e colaboradores (2004) encontraram um maior número de alelos em populações de campo do que em cepas de laboratório, atribuíram ao efeito fundador e aos freqüentes gargalos de garrafa (*bottleneck*, em inglês) populacionais durante a manutenção em laboratório o motivo dessa deficiência de alelos. Porém, eles não calcularam a divergência genética das populações pelos índices F_{ST} e R_{ST} .

Fazendo uma comparação com o número de alelos encontrados em nosso estudo com o anterior, poderíamos supor que os isolados de campo analisados estão passando por um processo de efeito fundador devido ao baixo n° de alelos encontrados. Entretanto, não podemos confirmar essa hipótese com os resultados encontrados pois utilizamos outros *loci* para o nosso estudo.

Populações de laboratório e de campo do molusco hospedeiro do parasito apresentaram pequena variabilidade genética quando analisado por SSR-PCR (CAMPOS *et al.*, 2002).

O índice de fixação (F_{ST}) pode ser usado entre pares de populações como uma estimativa da distância genética entre eles. O marcador utilizado para esse índice deve ter taxas de mutação baixas e a presença de similaridade das populações deve ser devido às migrações. Porém, os microssatélites possuem altas taxas de mutações havendo a possibilidade de surgir distorções em estimativas de uma série de parâmetros genéticos. Por esse motivo, SLATKIN (1995) desenvolveu um modelo estatístico, nomeado R_{ST} , análogo ao F_{ST} , para o estudo de divergência entre populações por ser adequado ao processo mais aceito atualmente de mutação dos microssatélites, modelo do passo único (Stepwise mutation model - SMM).

Segundo este modelo, alelos com tamanhos mais próximos são considerados mais similares do que alelos com tamanhos mais distantes.

As tabelas 8 e 9 apresentam os valores de F_{ST} e R_{ST} para as amostras estudadas e verifica-se uma grande diferenciação entre as matrizes, com valores superiores a 24%. Sugerido por WRIGHT (1978), os seguintes parâmetros qualitativos servem para a interpretação da diferenciação genética das amostras: 0-0,05 pequena, 0,05-0,15 moderada, 0,15-0,25 grande, e $>0,25$ indica uma diferenciação genética muito grande.

RODRIGUES e colaboradores (2002a), utilizando esses mesmos marcadores acima, compararam 10 isolados de campo do município de Dioniso-MG onde a prevalência da esquistossomose é maior do que 16%. Eles notaram uma pequena diversidade, não mais que 2,7% entre os isolados de campo, sugerindo um alto fluxo gênico na região.

Os valores encontrados para os 4 *loci* estudados demonstraram desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando uma possível deficiência de heterozigotos. A recente introdução dessa parasitose no RS pode ser o motivo desse encontro. Acredita-se que o longo tempo de manutenção em laboratório, das cepas LE e MAP, possa ser o motivo para esse achado.

Pelos microssatélites analisados não foi possível fazer uma correlação da resistência às drogas pela cepa MAP. A maioria dos alelos encontrados está presente em todas as amostras. Um estudo com outros *loci* poderia localizar a região genômica dos parasitos dessa cepa que conferem essa resistência.

Os nossos dados possivelmente sugerem que as populações de esquistossomos estudadas estão passando por um processo de efeito fundador, principalmente os isolados de Esteio. Outra alternativa poderia ser a pressão seletiva sobre os *loci* estudados, impedindo eles de acumularem mutações no decorrer das gerações.

A divergência genética encontrada abre caminho para um estudo mais amplo da população do parasito do Estado. Um estudo com uma amostra maior de vermes e/ou com um número maior de *loci* de microssatélites possa apresentar resultados diferentes dos aqui apresentados. Podendo, inclusive, esclarecer questões epidemiológicas em um foco de ultra baixa endemicidade.

7 CONCLUSÃO

Em relação aos resultados obtidos podemos chegar as seguintes conclusões:

- Não há diferença significativa entre os isolados Esteio e JV levando-se em consideração a maioria dos caracteres morfológicos analisados.
- Não há diferença notável do *Schistosoma mansoni* do foco de transmissão de Esteio com o conjunto de dados das cepas estudadas pela bibliografia.
- As variações observadas em alguns caracteres podem ser atribuídas à plasticidade fenotípica.
- Há uma grande divergência genética entre as populações estudadas quando comparados os isolados de campo com as cepas de laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARONI A., BARAN N., MANOR H. **Characterization of a multisubunit human protein which selectively bind single stranded d(GA)_n and d(GT)_n sequence repeats in DNA.** Nucleic Acids Research 21:5221-8. 1993.
- ALI P.O., SIMPSON A.J.G., ALLEN R., WATERS A.P., HUMPHRIES C.J., JOHNSTON D.A., ROLLINSON D. **Sequence of small subunit rRNA gene of *Schistosoma mansoni* and its use in phylogenetic analysis.** Molecular and Biochemical Parasitology 46:201-08. 1991.
- AQUADRO C.F., GREENBERG B.D. **Human mitochondrial DNA variation and evolution, analysis of nucleotide sequences from seven individuals.** Genetics 103:287-312. 1983.
- ARAÚJO N., KATZ N., DIAS E.P., SOUZA C.P. **Susceptibility to chemotherapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 29, 890-4. 1980.
- ARAÚJO N., KOHN A., KATZ N. **Activity of the artemether in experimental schistosomiasis mansoni.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 86 Suppl. 2:185-88. 1991.
- ASHLEY M.V., DOW B.D. **The use of microsatellite analysis in population biology, background, methods and potential applications.** Molecular Ecology and Evolution 69:185-201. 1994.
- BARKER G.C. **Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis.** Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 96(Suppl. 1): 21–24. 2002.
- BARRAL V., THIS P., IMBERT-ESTABLET D., COMBES C., DELSENY M. **Genetic variability and evolution of the *Schistosoma* genome analyzed by using random amplified polymorphic DNA markers.** Molecular and Biochemical Parasitology 59:211-22. 1993.
- BEAUMONT M.A., BRUFORD M.W. **Microsatellites in conservation genetics.** In: **Microsatellites: Evolution and Applications.** Edited by D.Goldsteins & Christian Schlotterer. Oxford University Press, New York. 1999.
- BECKMANN J.S., WEBER J.L. **Survey of human and rat microsatellites.** Genomics 12:627-31. 1992.
- BELKUM A.V., RAMESAR J., TROMMELEN G., UITTERLINDEN A.G. **Mini- and micro-satellites in the genome of rodent malaria parasites.** Gene 118:81-6. 1992.
- BELKUM A.V., SCHERER S., ALPHEN L. VERBRUGH H. **Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes.** Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(2):275-93. 1998.

BIGGIN M.D., TJIAN R. **Transcription factors that active the Ultra-bithorax promoter in developmentally staged extract.** Cell 53:699-711. 1988.

BLAIR L., WEBSTER J.P., BARKER G.C. **Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Schistosoma mansoni* from Africa.** Molecular Ecology Notes, 1: 93–5. 2001.

BRINDLEY P.J., HEATH S., WATERS A.P., McCUTCHAN T.F., SHER A. **Characterization of a programmed alteration in na 18S ribosomal gene that accompanies the experimental induction of drug resistance in *Schistosoma mansoni*.** Proceeding of National Academy of Sciences USA 88:7754-8. 1991.

BROWN W.M., GEORGE M., WILSON A.C. **Rapid evolution of animal mitochondrial DNA.** Proceeding of National Academy of Sciences USA 76:1967-71. 1979.

CAMPOS Y.R., CARVALHO O.S., GOVEIA C.O., ROMANHA A.J. **Genetic variability of the main intermediate host of the *Schistosoma mansoni* in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda:Planorbidae) assessed by SSR-PCR.** Acta Tropica 83:19-27. 2002.

CARVALHO O.S., NUNES I.M., CALDEIRA R.L. **First report of *Biomphalaria glabrata* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 93 (1):39-40. 1998.

CALLEN D.F., THOMPSON A.D., SHEN Y., PHILLIPS H.A., RICHARDS R.I., MULLEY J.C., SUTHERLAND G.R. **Incidence and origino f “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers.** American Journal of Human Genetics 52:922-27. 1993.

CHITSULO L., ENGELS D., MONTRESOR A., SAVIOLI L. **The global status of schistosomiasis and its control.** Acta Tropica. 77: 41–51. 2000.

COMBES C. **Where do human schistosomes come from? An evolutionary approach.** Trends in Ecology Evolution 5:334-37. 1990.

CONCEIÇÃO J.S., ARGENTO C.A., CORRÊA A. **Study of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with failure of treatment with oxamniquine.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 93(3):375-80. 2000.

COURA J.R., AMARAL R.S. **Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99 Suppl. 1:13-19. 2004.

CSINK A.K., HENIKOFF, S. **Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats.** Trends in Genetics 14:200-4. 1998.

CUNHA A. S. da. **Esquistossomose mansoni.** São Paulo – SP, Editora Sarvier. 1970, 435p.

CUNHA-NETO A.G. *Biomphalaria straminea* em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Atas Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro 15: 151. 1972.

CURTIS J., MINCHELLA D.J. **Schistosome population genetics structure: when clumping worms is not just splitting hairs.** Parasitology Today, 16: 68–71. 2000.

CURTIS J., SORENSEN R.E., PAGE K.L., MINCHELLA D.J. **Microsatellite loci in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and their utility for the other schistosome species.** Molecular Ecology Notes 1:143-5. 2001.

D'ANDREA O.S., MAROJA L.S., GENTILE R., CERQUEIRA R., MALDONADO Jr A., REY L. **The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea-Trematoda) in a naturally infected population of rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil.** Parasitology 120: 573-582. 2000.

SOUZA DIAS L.C., JESUS PEDRO R., DEBERALDINI E.R. **Use of praziquantel in patients with schistosomiasis mansoni previously treated with oxamniquine and/or hycanthone: resistance of *Schistosoma mansoni* to schistosomicidal agents.** Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 76:652-9. 1982.

DESPRES L., IMBERT-ESTABLET D., COMBES C., BONHOMME F., MONNEROT M. **Isolation and polymorphism in mitochondrial DNA from *Schistosoma mansoni*.** Molecular and Biochemical Parasitology 47:139-42. 1991.

DESPRES L., IMBERT-ESTABLET D., COMBES C., BONHOMME F. **Molecular evidence linking hominid evolution to recent radiation of Schistosomes (Platyhelminthes:Trematoda).** Molecular Phylogenetics and Evolution 1:295-304. 1992.

DIAS L.C.S., PIEDRABUENA A.E. **Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* in naturally infected *Holochilus brasiliensis*.** Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74:690. 1980.

DIAS L.C.S., JESUS P.R., DEBERALDINI E.R. **Use of praziquantel in patients with *Schistosoma mansoni* previously treated with oxaminiquine and/or hycanthone: resistance of *Schistosoma mansoni* to schistosomicidal agents.** Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 76, 652-9. 1982.

DIAS-NETO E., SANTOS F.R., PENA S.D.J., SIMPSON A.J.G. **Sex determination using LS-PCR.** Nucleic Acids Research 3:763-64. 1993a.

DIAS-NETO E., SOUZA C.P., ROLLINSON D., KATZ N., PENA S.D.J., SIMPSON A.J.G. **The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of *Schistosome*.** Molecular and Biochemical Parasitology 57:83-8. 1993b.

DIAS-NETO E., STEINDEL M., JANNOTTI-PASSOS L.K., SOUZA C.P., ROLLINSON D., KATZ N., ROMANHA A.J., PENA S.D.J., SIMPSON A.J.G. **The use of RAPDs for the study of genetic diversity of *Schistosoma mansoni* and**

Trypanosoma cruzi. In: **DNA Fingerprinting: State of the science**. PENA S.D.J., CHAKRABORTY R., EPPLEN J.T., JEFFREYS A.J., 339:45. Birkhäuser Verlag Basel – Switzerland. 1993c.

DIETRICH W.F., MILLER J., STEEN R., MERCHANT M.A., DAMRON-BOLES D., HUSAIN Z., DREDGE R., DALY M.J., INGALLS K.A., O'CONNOR T.J. **A comprehensive genetic map of the mouse genome**. *Nature* 380:149–52. 1996.

DREW A.C., BRINDLEY P.J. **Female-specific sequences isolated from *Schistosoma mansoni* by representational difference analysis**. *Molecular and Biochemical Parasitology* 71:173-181. 1995.

DURAND P., SIRE C., THÉRON A. **Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island**. *Molecular Ecology* 9: 997–8. 2000.

ELLEGREN H. **Microsatellites mutations in the germline: implications for evolutionary inference**. *Trends in Genetics* 16(12): 551-8. 2000.

ELLEGREN H. **Microsatellites: simple sequences with complex evolution**. *Nature Reviews Genetics* 5:435-45. 2004.

FIELD D., WILLS C. **Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae* and different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and variety of selective forces**. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 95:1647-52. 1998.

FLETCHER M., LoVERDE P.T., KUNTZ R.E. **Electrophoretic differences between *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini***. *Journal of Parasitology* 67:593-595. 1981a.

FLETCHER M., LoVERDE P.T., RICHARDS C.S. ***Schistosoma mansoni*, electrophoretic characterization of strains selected for different levels of infectivity to snails**. *Experimental Parasitology* 52:362-70. 1981b.

FLETCHER M., LoVERDE P.T., WOODRUFF D.S. **Genetic variation in *Schistosoma mansoni*: enzyme polymorphisms in populations from Africa, Southwest Asia, South America and the West Indies**. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30:406-21. 1981c.

FRANCO G.R., VALADÃO A.F., AZEVEDO A., RABELO E.M.L. **The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art**. *International Journal of Parasitology* 30:453-63. 2000.

FRANSEN F. **Discussion of the relationship between *Schistosoma* and their intermediate hosts, assessment of the degree of host-parasite compatibility and evaluation of schistosome taxonomy**. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 58: 275-96. 1979.

GASSER R.B., MORAHAN G., MITCHELL G.F. **Sexing single larval stages of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction.** Molecular and Biochemical Parasitology 47:255-258. 1991.

GRAEFF-TEIXEIRA C., ANJOS C.B., OLIVEIRA V.C., VELLOSO, C.F.P., FONSECA B.S., VALAR C., MORAES C., GARRIDO C.T., AMARAL R.S. **Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the southernmost Brazilian state, Rio Grande do Sul.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94 (1): 9-10. 1999.

GRAEFF-TEIXEIRA C., VALAR C., MORAES C.K. de, SALVANY A.M., BRUM C. de O., MAURER R.L., BEN R., MARDINI L.B.L.F., JOBIM M.B., AMARAL R.S. **The Initial Epidemiological Studies in the Low Endemicity Schistosomiasis Area in Esteio, Rio Grande do Sul, the Southernmost Brazilian State, 1997 to 2000.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99(Suppl. I): 73-8. 2004.

GUR-ARIE R., COHEN C., EITAN Y., SHELEF L., HALLERMAN E., KASHI Y. **Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: Abundance, distribution, composition and polymorphism.** Genome Research 10:62-71. 2000.

HAGELBERG E., GRAY I.C., JEFFREYS A.J. **Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis.** Nature 352:427-9. 1992.

HAMADA H., PETRINO M.G., KAKUNAGA T. **A novel repeat element with Z DNA forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes.** Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 79:6455-69. 1982.

HANCOCK J. **The contribution of slippage-like processes to genome evolution.** Journal of Molecular Evolution 41:1038-47. 1995.

HANCOCK J. **Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms.** In: **Microsatellites: Evolution and Applications.** Edited by D.Goldsteins & Christian Schlötterer. Oxford University Press, New York. 1999.

HARRISON R.G. **Animal mitochondrial DNA as genetic marker in populational and evolutionary biology.** Trends in Ecology and Evolution 46:06-11. 1989.

HARTL D.L., & CLARK A. G.. **Principals of population genetics.** 3. ed. 23 Plumtree Road, Sunderland, MA, 01375 USA: Sinauer Associates, Inc.1997, 542p.

HIRAI H., LoVERDE P.T. **Identification of the telomeres on *Schistosoma mansoni* chromosomes by FISH.** Journal of Parasitology 82:511-512. 1996.

HOEKSTRA R., CRIADO-FORNELIO A., FAKKELDIJ J., BERGMAN J., ROOS M.H. **Microsatellites of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*: polymorphism and linkage with a direct repeat.** Molecular and Biochemical Parasitology 89:97-107. 1997.

IMBERT-ESTABLET D., COMBES C. ***Schistosoma mansoni*: comparison of a Caribbean and African strain and experimental crossing based on compatibility with intermediate hosts and *Rattus rattus***. Experimental Parasitology 61, 210-8. 1986.

JANNOTTI-PASSOS L.K., VIDIGAL T.H.D.A., DIAS-NETO E., PENA S.D.J., SIMPSON A.J.G., DUTRA W.O., SOUZA C.P., CARVALHO-PARRA J.F. **PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails**. Journal of Parasitology 83:395-99. 1997.

JARNE P., LAGODA J.L. **Microsatellites, from molecules to populations and back**. Trends in Ecology and Evolution 11:424-429. 1996.

JOHNSTON D.A., KANE R.A., ROLLINSON D. **Small subunit (18S) ribosomal RNA gene divergence in the genus *Schistosoma***. Parasitology 107:147-56. 1993.

KASSIM O.O., CHEEVER A.W., RICHARDS C.S. ***Schistosoma mansoni*: mice infected with different worm strains**. Experimental Parasitology 48, 220-4. 1979.

KASTNER M.R.Q., KOHN A., TEIXEIRA E. D., PITANGA L.C. **Estudo morfológico do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 encontrado na espécie humana**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 9:247-61. 1975.

KATZ N. **Vacina polivalente anti-helmintos?** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento 2:34-5. 1997.

KAUKAS A., DIAS-NETO E., SIMPSON A.J.G., SOUTHGATE V.R., ROLLINSON D. **A phylogenetic analysis of *Schistosoma haematobium* group species based on randomly amplified polymorphic DNA**. International Journal of Parasitology 24(2):285-90. 1994.

KOHN A., COTTA-PEREIRA G., ALVAREZ-LOPEZ M. L., KATTENBACH W.M. **Oxytalan fibers in the *Schistosoma mansoni* tegument**. Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas 12(4-5): 335-38. 1979a.

KOHN A., SERAPIÃO C. J., KATZ N., DIAS E. P. **Ação da oxamniquina sobre o *Schistosoma mansoni* em camundongos experimentalmente infectados**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 21(5): 217-27. 1979b.

LE T.H., BLAIR D., AGATSUMA T., HUMAIR P.F., CAMPBELL N.J., IWAGAMI M., LITTLEWOOD D.T., PEACOCK B., JOHNSTON D.A., BARTLEY J., ROLLINSON D., HERNIOU E.A., ZARLENGA D.S., McMANUS D.P. **Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders – a cautionary tale from the parasitic flatworms**. Molecular and Biological Evolution 7:1123-25. 2000.

LITT M., LUTY J.A. **A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene**. Genetics 44:397-401. 1989.

LOCKYER A.E., OLSON P.D., OSTERGAARD P., ROLLINSON D., JOHNSTON D.A., ATTWOOD S.W., SOUTHGATE V.R., HORAK P., SNYDER S.D., LE T.H., AGATSUMA T., McMANUS D.P., CARMICHAEL A.C., NAEM S., LITTLEWOOD D.T. **The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858.** Parasitology, 126: 203–24. 2003.

LoVERDE P.T., DEWALD J., MINCHELLA D.J. **Further studies on genetic variation in *Schistosoma mansoni*.** Journal of Parasitology 71:732-34. 1985a.

LoVERDE P.T., DEWALD J., MINCHELLA D.J., BOSSHARDT C.C., DAMIAN R.T. **Evidence of host-induced selection in *Schistosoma mansoni*.** Journal of Parasitology 71:297-301. 1985b.

LUE N.L., BUCHMAN A.R., KORNBERG R.D. **Activation of yeast RNA polymerase II transcription by a thymidine-rich upstream element *in vitro*.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86:486-90. 1989.

MACHADO-SILVA J.R., GALVÃO C., PRESGRAVE O.A.F., REY L., GOMES D.C. **Host-induced morphological changes of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 male worms.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 89: 411-16. 1994.

MACHADO-SILVA J.R., GALVÃO C., OLIVEIRA R.M.F., PRESGRAVE O.A.F., GOMES D.C. ***Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: Comparative morphological studies of same brazilian strains.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 37:441-47. 1995.

MACHADO-SILVA J.R., PELAJO-MACHADO M., LENZI H.L., GOMES D.C. **Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 93 (suppl 1): 303-07. 1998.

MAGALHÃES L.A., CARVALHO J.F. **Estudo morfológico de *Schistosoma mansoni* pertencentes a linhagens de Belo Horizonte (MG) e de São José dos Campos (SP).** Revista de Saúde Pública de São Paulo 7: 289-94. 1973.

MARTINEZ E.M., NEVES R. H., OLIVEIRA R.M.F. de, MACHADO-SILVA J.R., REY L. **Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36(5):557-64. 2003.

MARX K.A., BIZZARO J.W., BLAKE R.D., TSAI M.-H., TAO L.-F. **Experimental DNA melting behavior of the three major *Schistosoma* species.** Molecular and Biochemical Parasitology 107: 303–7. 2000.

McCUTCHAN T.F., SIMPSON A.J.G., MULLINS J.A., SHER A., NASH T.E., LEWIS F., RICHARDS C. **Differentiation of schistosomes by species, strain and sex using cloned DNA markers.** Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America 81:889-93. 1984.

McMANUS D.P., HOPE M. **Molecular variation in the human schistosomes.** Acta Tropica 53:255-76. 1993.

MENZEL M.Y., SHORT R.B. **Pachytene chromosomes in three species of Schistosomes; sex and autosomal bivalents in males and females.** Journal of Heredity 51:2-12. 1960.

MEYNE J., RATLIFF R.L., MOYZIS R.K. **Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates.** Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America 86: 7049–53. 1989.

MONÉ H., MOUAHID G., SHABAN M.A., JABRI A.A.A., BOISSIER J., RUPPEL A., IDRIS M.A. **Ecological and molecular studies on emerging schistosomiasis mansoni in Dhofar Governorate, Sultanate of Oman.** Tropical Medicine and International Health 8(3):269-76. 2003.

MOYZIS R.K., BUCKINGHAM J.M., CRAM L.S., DANI M., DEAVEN L.L., JONES M.D., MEYNE J., RATLIFF R.L., WU J.R. **A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes.** Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America 85: 6622–26. 1988.

MULLIS K.B., FALOONA F. **Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction.** Methods in Enzymology 155:335-50. 1987.

NAVARRO M.C., CESARI I.M., INCANI R.M. **Isoenzyme studies in one Brazilian and two Venezuelan strains of *Schistosoma mansoni*.** Compendius of Biochemistry and Physiology 102(b):471-74. 1992.

NEVES R.H., PEREIRA M.J.S., OLIVEIRA R.M.F., GOMES D.C., MACHADO-SILVA J.R. ***Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: morphometric differences between adult worms from sympatric rodent and human isolates.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 93:309-12. 1998.

NEVES R.H., COSTA-SILVA M., MARTINEZ E.M., BRANQUINHO T.B., OLIVEIRA R.M.F. de, LENZI H.L., GOMES D.C., MACHADO-SILVA J.R. **Phenotypic plasticity in adult worms of *Schistosoma mansoni* (Trematoda:Schistosomatidae) evidenced by brightfield and confocal laser scanning microscopies.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99(2):131-36. 2004.

OLIVEIRA R.P., BROUDE N.E., MACEDO A.M., CANTOR C.R., SMITH C.L., PENA S.D.J. **Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites.** Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America 95:3776-80. 1998.

OLIVEIRA S.A., BARBOSA A.A.Jr., GOMES D.C., MACHADO-SILVA J.R. BARROS A.F., NEVES R.H., COUTINHO E.M. **Morphometric study of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished infected mice.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98(5):623-27. 2003.

PARAENSE W.L., CORRÊA L.R. **Observations on two biological races of *Schistosoma mansoni***. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 76:287-91. 1981.

PARAENSE W.L., CORRÊA L.R. **Probable extension of schistosomiasis mansoni to Southernmost Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 82 (4): 577. 1987.

PELLEGRINO J., KATZ N., SCHERRER J.F. **Experimental chemotherapy of schistosomiasis. I. Laboratory trials with R.D. 12.869, a new aminoquinoline**. Journal of Parasitology 53:1225-8. 1967.

PENA H.B., SOUZA C.P., SIMPSON A.J.G., PENA S.D.J. **Intracellular promiscuity in *Schistosoma mansoni*: Nuclear transcribed DNA sequences are part of a mitochondrial minisatellite region**. Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America 92: 915-19. 1995.

PESSÔA S.B., MARTINS A.V. **Parasitologia Médica**. 11ª edição. Rio de Janeiro – RJ. Editora Guanabara Koogan. 1988. 872p.

PIRAJÁ da SILVA M.A. **Contribuição para o estudo da schistosomíase na Bahia**. Brazil Med. 22:281-83. 1908.

PITCHFORD R.J. **A check list of definitive hosts exhibiting evidence of the genus *Schistosoma* Weinland, 1858 acquired naturally in Africa and Middle East**. Journal of Helminthology 51:229-52. 1979.

POULIN R. **The evolution of the life history strategies in parasitic animals**. Advances in Parasitology 37: 107-134. 1996.

PRESTON H.B. **Additions to the non-marine molluscan fauna of British and German East Africa and Lake Albert Edward**. Ann. Mag. Nat. Hist. 8th ser., 6:526-36. London. 1910.

PRUGNOLLE F., De MEEUS T., DURAND P., SIRE C., THÉRON A. **Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications**. Molecular Ecology 11: 1231–8. 2002.

RAYMOND M., ROUSSET F. **An exact test for population differentiation**. Evolution 49:1280-83. 1995.

REY L. **Parasitologia**. 3ª Edição. Rio de Janeiro - RJ, Editora Guanabara Koogan. 2001. 856p.

REY L. **Bases da parasitologia médica**. 2ª Edição. Rio de Janeiro – RJ, Editora. Guanabara Koogan. 2002. 379p.

RICHARDS C.S., SHADE P.C. **The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni***. Journal of Parasitology 73, 1146-51. 1987.

RODRIGUES N.B., COURA Filho P., de SOUZA C.P., JANNOTI-PASSOS L.K., DIAS-NETO E., ROMANHA A.J. **Populational structure of *Schistosoma mansoni* assessed by DNA microsatellites**. International Journal of Parasitology 32: 843–51. 2002a.

RODRIGUES N.B., LoVERDE P.T., ROMANHA A.J., OLIVEIRA G. **Characterization of new *Schistosoma mansoni* microsatellite loci in sequences obtained from public DNA databases and microsatellite enriched genomic libraries**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97(Suppl. 1): 71–5. 2002b.

RODRIGUEZ HIRSCH, Steve. **Alterações ultra-estruturais dos vermes adultos do *Schistosoma mansoni* obtidos de camundongos infectados e tratados com oxamniquine, praziquantel, oltipraz e suas associações**.. Tese de doutorado, CPqRR – FIOCRUZ – MG. 1986.

RODRIGUEZ N., DE LIMA H., RODRIGUEZ A., BREWSTER S. BARKER D.C. **Genomic DNA repeat from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites**. Parasitology 115:349-58. 1997.

ROSSI V., WINCKER P., RAVEL C., BLAINEAU C., PAGÉS M., BASTIEN P. **Structural organization of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci**. Molecular and Biochemical Parasitology 65:271-82. 1994.

RUSSEL R., IRIBAR M.P., LAMBSON B., BREWESTER S., BLACKWELL J.M., DYE C., AJIOKA J.W. **Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* sub genus *Viannia***. Molecular and Biochemical Parasitology 103:71-7. 1999.

SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARHEIM N. **Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia**. Science 230:1350-54. 1985.

SAMBON L.W. **Remarks on *Schistosoma mansoni***. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 10: 303-304. 1907.

SANGUINETTI C.J., DIAS NETO E., SIMPSON J.G.A. **Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels**. BioTechniques, 42: 915-918. 1994.

SANTOS M.M.A.G. **Avaliação do uso de saliva e transudato oral para o diagnóstico imunológico da esquistossomose mansoni**. Tese de mestrado, 93p. CPqRR, FIOCRUZ – MG. 1996.

SAY T. **Account of two new genera, and several new species, of fresh water and land shells**. J. Acad. Nat. Sci. Phil. 1(2):276-284. Philadelphia. 1818.

SCHNEIDER S., ROESSLI D., EXCOFFIER L. **Arlequin ver 2.000, a software for population genetic data analysis.** Genetics and biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. 2000.

SCHLÖTTERER C., TAUTZ D. **Slippage synthesis of simple sequence DNA.** Nucleic Acids Research 20:211-15. 1992.

SCHUG M.D., WETTERSTRAND K.A., GAUDETTE M.S. **The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*.** Molecular Ecology 7:57-70. 1998.

SHORT R.B., MENZEL M.Y. **Chromosomes of nine species of schistosomes.** Journal of Parasitology 46:273-87. 1960.

SHORT R.B., MENZEL M.Y., PATHAK S. **Somatic chromosomes of *Schistosoma mansoni*.** Journal of Parasitology 65:471-73. 1979.

SHORT R.B., GROSSMAN A.I. **Conventional geimsa and C-banded karyotypes of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*.** Journal of Parasitology 67:661-67. 1981.

SIMPSON A.J.G., SHER A., McCUTCHAN T.F. **The genome of *Schistosoma mansoni*, isolation of DNA, its size and repetitive sequences.** Molecular and Biochemical Parasitology 6:125-37. 1982.

SIMPSON A.J.G., DAME J.B., LEWIS F.A., McCUTCHAN T.F. **The arrangement of ribosomal RNA genes in *Schistosoma mansoni* – Identification of polymorphic structural variants.** European Journal of Biochemistry 139:41-5. 1984.

SLATKIN M. **A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies.** Genetics, 139: 457-462. 1995.

SMITH A.L., HUGGINS M.C., HAVERCROFT J.C. ***Schistosoma mansoni*, adult males and females differently express antigens encoded by repetitive genomic DNA.** Parasitology 105:63-9. 1992.

SNYDER S.D., LOKER E. **Evolutionary relationship among the schistosomatidae (Platyhelminths:Digenea) and an Asian origin for *Schistosoma*.** Journal of Parasitology 86:283-88. 2000.

SPOTILA L.D., REKOSH D.M., BOUCHER J.M., LoVERDE P.T. **A cloned DNA probe identifies the sex of *Schistosoma mansoni* cercariae.** Molecular and Biochemical Parasitology 26:17-20. 1987.

SPOTILA L.D., HIRAI H., REKOSH D.M., LoVERDE P.T. **A retroposon-like short repetitive DNA element in the genome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*.** Chromosoma 97:421-8. 1989.

SPOTILA L.D., REKOSH D.M., LoVERDE P.T. **Polymorphic repeated DNA element in the genome of *Schistosoma mansoni*.** Molecular and Biochemical Parasitology 48:117-20. 1991.

STALLINGS R.S. **CpG suppression in vertebrate genomes does not account for the rarity of (CpG) microsatellite repeats.** *Genomics* 17:890-1. 1992.

STOHLER R.A., CURTIS J., MINCHELLA D.J. **A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*.** *International Journal of Parasitology* 34:595-601. 2004.

SU X., WELLEMS T.E. **Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map, polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats.** *Genomics* 33:430-44. 1996.

TAUTZ D. **Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers.** *Nucleic Acids Research* 17:4123-30. 1989.

TÓTH G., GÁSPÁRI Z., JURKA J. **Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis.** *Genome Research* 10:967-81. 2000.

VALADARES T.E., COELHO P.M.Z., PELEGRINO J., SAMPAIO I.B.M. ***Schistosoma mansoni*: aspectos da oviposição da cepa LE em camundongos infectados com um casal de vermes.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 23, 6–11. 1981.

VAN KEULEN H., LoVERDE P.T., BOBEK L.A., REKOSH D.M. **Organization of the ribosomal RNA genes in *Schistosoma mansoni*.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 15:215-30. 1985.

VERJOVSKI-ALMEIDA S., DeMARCO R., MARTINS E.A., GUIMARÃES P.E., OJOPI E.P., PAQUOLA A.C., PIAZZA J.P., NISHIYAMA M.Y., KITAJIMA J.P., ADAMSON R.E., ASHTON P.D., BONALDO M.F., COULSON P.S., DILLON G.P., FARIAS L.P., GREGORIO S.P., HO P.L., LEITE R.A., MALAQUIAS L.C., MARQUES R.C., MIYASATO P.A., NASCIMENTO A.L., OHLWEILER F.P., REIS E.M., RIBEIRO, M.A., SA R.G., STUKART G.C., SOARES M.B., GARGIONI C., KAWANO T., RODRIGUES V., MADEIRA A.M., WILSON R.A., MENCK C.F., SETUBAL J.C., LEITE L.C., DIAS-NETO E. **Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*.** *Nature Genetics* 35(2): 148–157. 2003.

VIEIRA L.Q., OLIVEIRA R.C., KATZ N., SOUZA C.P., CARVALHO O.S., ARAÚJO N., SHER A., BRINDLEY P.J. **Genomic variability in field populations of *Schistosoma mansoni* in Brazil as detected with a ribosomal gene probe.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44:69-78. 1991.

WALKER T.K., ROLLINSON D., SIMPSON A.J.G. **Differentiation of *Schistosoma haematobium* from related species using cloned ribosomal RNA probes.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 20, 123-31. 1986.

WALKER T.K., SIMPSON A.J.G., ROLLINSON D. **Differentiation of *Schistosoma mansoni* from *S. rodhaini* using cloned probes.** *Parasitology* 98, 75-80. 1989.

WANG Z., WEBER J.L., ZHONG G., TANKSLEY S.D. **Survey of plant short tandem DNA repeats.** Theoretical and Applied Genetics 88:1-6. 1994.

WEBER J.L., MAY P.E. **Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction.** American Journal of Human Genetics 44:388-396. 1989.

WEBER J.L. **Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms.** Genomics 7:524-30. 1990.

WEBSTER P., MANSOUR T.E., BIEBER D. **Isolation of female specific highly repeated *Schistosoma mansoni* DNA probe and its use in an assay of cercarial sex.** Molecular and Biochemical Parasitology 36:217-22. 1989.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The control of schistosomiasis, second report of the WHO expert committee, Technical Report series 830.** Geneva, Switzerland, 86pp. 1993.

WHO-World Health Organization. Strategy development and monitoring for parasitic diseases and vector control (PVC). **Report of the WHO informal consultation on Schistosomiasis in low transmission areas: control strategies and criteria for elimination.** 86p. 2001.

WREN J.D., FORGACS E., FONDON J.W. **Repeat polymorphisms within gene regions: Phenotypic and evolutionary implications.** American Journal of Human Genetics 67:345-56. 2000.

WRIGHT, S..**Systems of mating.** Genetics, 6: 111-178. 1921.

ZARLENGA D.S., ASCHENBRENNER R.A., LICHTENFELS J.R. **Variations in microsatellite sequence provide evidence for population differences and multiple ribosomal gene repeats within *Trichinella pseudospiralis*.** Journal of Parasitology 82:534-8. 1996.

DOCUMENTOS E FONTES EM MEIO ELETRÔNICO

<http://www.ibge.gov.br>

Sítio do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística para pesquisa dos dados do censo demográfico brasileiro e suas estimativas. Acesso em: 12 de janeiro de 2005.

http://www.nhm.ac.uk/hosted_sites/schisto

Sítio do projeto *Schistosome Genome Network*, e atividades dos pesquisadores envolvidos. Acesso em: 08 de março de 2004

<http://lgb.unige.ch/arlequin>

Sítio para baixar o programa Arlequin 2.000 para análises de genética populacional. Acesso em: 20 de abril de 2004.

APÊNDICE

Amostra do isolado Esteio

Project information:

```
-----  
NbSamples      = 1  
DataType       = MICROSAT  
GenotypicData  = 1  
GameticPhase   = 1  
RecessiveData  = 0
```

```
=====  
Settings used for Calculations  
=====
```

General settings:

```
-----  
Deletion Weight           = 1  
Transition Weight Weight  = 1  
Tranversion Weight Weight = 1  
Epsilon Value             = 1e-07  
Significant digits for output = 5  
Use original haplotype definition  
Allowed level of missing data = 0.05
```

Active Tasks:

Standard indices:

Hardy-Weinberg equilibrium test:

```
-----  
No. of steps in Markov chain      = 100000  
No. of Dememorisation Steps       = 1000  
Required precision on Probability = 0  
Significance level                 = 2  
Test association at the Locus and Haplotype levels
```

```
=====  
ANALYSES AT THE INTRA-POPULATION LEVEL  
=====
```

```
=====  
Sample :      Esteio  
=====
```

```
=====  
Standard diversity indices : (Esteio)  
=====
```

Reference: *Nei, M., 1987.*

```
No. of gene copies      : 80  
No. haplotypes         : 45  
No. of loci            : 4
```

No. of usable loci : 4 loci with less than 5.00 % missing data
 No. of polymorphic sites : 4
 Gene diversity : 0.9804 +/- 0.0056

Allele Data base content:

Alleles for the locus 0:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.2875	0.0509	322
2	0.7125	0.0509	328

Alleles for the locus 1:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.4125	0.0554	256
2	0.5875	0.0554	259

Alleles for the locus 2:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.2750	0.0502	450
2	0.2125	0.0460	478
3	0.0375	0.0214	482
4	0.1250	0.0372	454
5	0.0875	0.0318	462
6	0.0625	0.0272	470
7	0.0250	0.0176	?
8	0.0875	0.0318	458
9	0.0750	0.0296	446
10	0.0125	0.0125	466

Alleles for the locus 3:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.6625	0.0532	158
2	0.2500	0.0487	146
3	0.0625	0.0272	152
4	0.0250	0.0176	161

=====
 Hardy-Weinberg equilibrium : (Esteio)
 =====

Reference: Guo, S. and Thompson, E. 1992.
 Levene H. (1949).

Exact test using a Markov chain (for all Loci):

Forecasted chain length :100000
 Dememorization steps :1000

Locus	#Genot	Obs.Heter.	Exp.Heter.	P. value	s.d.	Steps done
0	40	0.22500	0.41487	0.00544	0.00022	100172
1	40	0.57500	0.49082	0.33520	0.00139	100172
2	39	0.38462	0.85148	0.00000	0.00000	100172
3	40	0.17500	0.52278	0.00000	0.00000	100172

Exact test using a Markov chain (for all Haplotypes):
Forecasted chain length :100000
Dememorization steps :1000

Markov Chain test: P value : 0.01080 +/- 0.00009 (100172 steps done)

Amostra do isolado JV

Project information:

NbSamples = 1
DataType = MICROSAT
GenotypicData = 1
GameticPhase = 1
RecessiveData = 0

Settings used for Calculations

General settings:

Deletion Weight = 1
Transition Weight Weight = 1
Tranversion Weight Weight = 1
Epsilon Value = 1e-07
Significant digits for output = 5
Use original haplotype definition
Allowed level of missing data = 0.05

Active Tasks:

Standard indices:

Hardy-Weinberg equilibrium test:

No. of steps in Markov chain = 100000
No. of Dememorisation Steps = 1000
Required precision on Probability = 0
Significance level = 2
Test association at the Locus and Haplotype levels

ANALYSES AT THE INTRA-POPULATION LEVEL

=====
Sample : JV
=====

=====
 Standard diversity indices : (JV)
 =====

Reference: *Nei, M., 1987.*

No. of gene copies : 82
 No. haplotypes : 41
 No. of loci : 4
 No. of usable loci : 4 loci with less than 5.00 % missing data
 No. of polymorphic sites : 4
 Gene diversity : 0.9425 +/- 0.0153

Allele Data base content:

Alleles for the locus 0:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.4146	0.0547	322
2	0.5854	0.0547	328

Alleles for the locus 1:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.5000	0.0556	256
2	0.4024	0.0545	259
3	0.0976	0.0330	262

Alleles for the locus 2:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.0366	0.0209	470
2	0.4146	0.0547	478
3	0.2073	0.0450	450
4	0.2073	0.0450	454
5	0.0244	0.0171	482
6	0.0244	0.0171	474
7	0.0244	0.0171	466
8	0.0122	0.0122	486
9	0.0122	0.0122	490
10	0.0122	0.0122	462
11	0.0244	0.0171	458

Alleles for the locus 3:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.1829	0.0430	152
2	0.5976	0.0545	158
3	0.0732	0.0289	146
4	0.0244	0.0171	?
5	0.0976	0.0330	161
6	0.0244	0.0171	155

=====
Hardy-Weinberg equilibrium : (JV)
=====

Reference: *Guo, S. and Thompson, E. 1992.*
Levene H. (1949).

Exact test using a Markov chain (for all Loci):
Forecasted chain length :100000
Dememorization steps :1000

Locus	#Genot	Obs.Heter.	Exp.Heter.	P. value	s.d.	Steps done
0	41	0.53659	0.51551	0.74713	0.00138	100172
1	41	0.68293	0.58567	0.02405	0.00049	100172
2	41	0.34146	0.75821	0.00000	0.00000	100172
3	40	0.57500	0.58291	0.00000	0.00000	100172

Exact test using a Markov chain (for all Haplotypes):
Forecasted chain length :100000
Dememorization steps :1000

Markov Chain test: P value : 0.02646 +/- 0.00009 (100172 steps done)

Amostra da cepa LE

Project information:

NbSamples = 1
DataType = MICROSAT
GenotypicData = 1
GameticPhase = 1
RecessiveData = 0

=====
Settings used for Calculations
=====

General settings:

Deletion Weight = 1
Transition Weight Weight = 1
Tranversion Weight Weight = 1
Epsilon Value = 1e-07
Significant digits for output = 5
Use original haplotype definition
Allowed level of missing data = 0.05

Active Tasks:

Standard indices:

Hardy-Weinberg equilibrium test:

No. of steps in Markov chain = 100000
No. of Dememorisation Steps = 1000
Required precision on Probability = 0

Significance level = 2
Test association at the Locus and Haplotype levels

=====
== ANALYSES AT THE INTRA-POPULATION LEVEL
=====

=====
== Sample : LE
=====

=====
== Standard diversity indices : (LE)
=====

Reference: *Nei, M., 1987.*

No. of gene copies : 80
No. haplotypes : 56
No. of loci : 4
No. of usable loci : 4 loci with less than 5.00 % missing data
No. of polymorphic sites : 4
Gene diversity : 0.9848 +/- 0.0059

Allele Data base content:

Alleles for the locus 0:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.2750	0.0502	328
2	0.2125	0.0460	334
3	0.0250	0.0176	322
4	0.2875	0.0509	325
5	0.1500	0.0402	331
6	0.0250	0.0176	343
7	0.0250	0.0176	340

Alleles for the locus 1:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.4000	0.0551	256
2	0.1625	0.0415	262
3	0.2750	0.0502	259
4	0.0875	0.0318	265
5	0.0750	0.0296	253

Alleles for the locus 2:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.3125	0.0521	466
2	0.0375	0.0214	462
3	0.2000	0.0450	450
4	0.0125	0.0125	486
5	0.3125	0.0521	478
6	0.0375	0.0214	474
7	0.0625	0.0272	454
8	0.0250	0.0176	494

Alleles for the locus 3:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.1000	0.0338	149
2	0.4000	0.0551	158
3	0.5000	0.0563	146

=====
== Hardy-Weinberg equilibrium : (LE)
=====

Reference: *Guo, S. and Thompson, E. 1992.*
Levene H. (1949).

Exact test using a Markov chain (for all Loci):

Forecasted chain length :100000
Dememorization steps :1000

Locus	#Genot	Obs.Heter.	Exp.Heter.	P. value	s.d.	Steps done
0	40	0.72500	0.78291	0.00000	0.00000	100172
1	40	0.62500	0.75411	0.00059	0.00008	100172
2	40	0.57500	0.77532	0.00000	0.00000	100172
3	40	0.75000	0.58734	0.15067	0.00092	100172

Exact test using a Markov chain (for all Haplotypes):

Forecasted chain length :100000
Dememorization steps :1000

Markov Chain test: P value : 0.30845 +/- 0.00007 (100172 steps done)

Amostra da cepa MAP

Project information:

NbSamples = 1
DataType = MICROSAT
GenotypicData = 1
GameticPhase = 1
RecessiveData = 0

=====
Settings used for Calculations
=====

General settings:

Deletion Weight = 1
Transition Weight Weight = 1
Tranversion Weight Weight = 1
Epsilon Value = 1e-07
Significant digits for output = 5
Use original haplotype definition
Allowed level of missing data = 0.05

Active Tasks:

Standard indices:

Hardy-Weinberg equilibrium test:

No. of steps in Markov chain = 100000
No. of Dememorisation Steps = 1000
Required precision on Probability = 0
Significance level = 2
Test association at the Locus and Haplotype levels

=====
== ANALYSES AT THE INTRA-POPULATION LEVEL
=====

=====
== Sample : MAP
=====

=====
== Standard diversity indices : (MAP)
=====

Reference: *Nei, M., 1987.*

No. of gene copies : 80
No. haplotypes : 55
No. of loci : 4
No. of usable loci : 4 loci with less than 5.00 % missing data
No. of polymorphic sites : 4
Gene diversity : 0.9845 +/- 0.0054

Allele Data base content:

Alleles for the locus 0:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.3250	0.0527	322
2	0.4000	0.0551	328
3	0.2250	0.0470	331
4	0.0500	0.0245	325

Alleles for the locus 1:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.5125	0.0562	259
2	0.0500	0.0245	256
3	0.0375	0.0214	268
4	0.3500	0.0537	262
5	0.0500	0.0245	271

Alleles for the locus 2:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.1625	0.0415	482
2	0.1875	0.0439	454
3	0.0500	0.0245	486
4	0.2375	0.0479	450
5	0.2000	0.0450	458
6	0.0500	0.0245	446
7	0.0250	0.0176	478
8	0.0125	0.0125	466
9	0.0375	0.0214	470
10	0.0125	0.0125	462
11	0.0250	0.0176	?

Alleles for the locus 3:

No.	Freq.	s.d.	Allele:
1	0.6625	0.0532	149
2	0.1375	0.0387	158
3	0.1000	0.0338	152
4	0.0500	0.0245	161
5	0.0125	0.0125	170
6	0.0125	0.0125	173
7	0.0250	0.0176	?

=====
== Hardy-Weinberg equilibrium : (MAP)
=====

Reference: *Guo, S. and Thompson, E. 1992.*
Levene H. (1949).

Exact test using a Markov chain (for all Loci):
Forecasted chain length :100000
Dememorization steps :1000

Locus	#Genot	Obs.Heter.	Exp.Heter.	P. value	s.d.	Steps done
0	40	0.35000	0.71297	0.00000	0.00000	100172
1	40	0.42500	0.62880	0.00128	0.00011	100172
2	39	0.35897	0.84682	0.00000	0.00000	100172
3	39	0.28205	0.51382	0.00000	0.00000	100172

Exact test using a Markov chain (for all Haplotypes):
Forecasted chain length :100000
Dememorization steps :1000

Markov Chain test: P value : 0.00000 +/- 0.00000 (100172 steps done)

Análise interpopulacional

```
=====  
== Comparisons of pairs of population samples  
=====
```

List of labels for population samples used below:

```
Label   Population name  
-----  
1:      JV  
2:      Esteio  
3:      LE  
4:      MAP
```

Population pairwise FSTs

```
Distance method: No. of different alleles (FST)  
                   1         2         3         4  
1      0.00000  
2      0.03193   0.00000  
3      0.12833   0.13088   0.00000  
4      0.19341   0.20198   0.19095   0.00000
```

```
=====  
== Comparisons of pairs of population samples  
=====
```

List of labels for population samples used below:

```
Label   Population name  
-----  
1:      JV  
2:      Esteio  
3:      LE  
4:      MAP
```

Population pairwise FSTs

```
Computing conventional F-Statistics from haplotype frequencies  
                   1         2         3         4  
1      0.00000  
2      0.01546   0.00000  
3      0.03361   0.01603   0.00000  
4      0.03698   0.02301   0.01616   0.00000
```

=====
Comparisons of pairs of population samples
=====

List of labels for population samples used below:

Label	Population name
1:	JV
2:	Esteio
3:	LE
4:	MAP

Matrix of Slatkin linearized FSTs as $t/M=FST/(1-FST)$ (M=N for haploid data,
M=2N for diploid data)

Reference: *Slatkin, M., 1995.*

	1	2	3	4
1	0.00000			
2	0.03299	0.00000		
3	0.14722	0.15059	0.00000	
4	0.23979	0.25309	0.23602	0.00000