

## Parte II - Hospedeiros intermediários

### 16 - Aspectos genéticos da interação *Biomphalaria-Schistosoma mansoni*

Florence Mara Rosa  
Paulo Marcos Zech Coelho  
Deborah A. Negrão-Corrêa  
Ana Lúcia Brunialt Godard

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

ROSA, FM., *et al.* Aspectos genéticos da interação *Biomphalaria-Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 511-527. ISBN 978-85-7541-370-8. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

---



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

# 16

## Aspectos Genéticos da Interação *Biomphalaria-Schistosoma* *mansoni*

Florence Mara Rosa  
Paulo Marcos Zech Coelho  
Deborah A. Negrão-Corrêa  
Ana Lúcia Brunialti Godard

Cruzamento entre  
*Biomphalaria tenagophila* de Joinville e  
*Biomphalaria tenagophila* do Taim.



Este capítulo tem como objetivo apresentar os aspectos genéticos que regem a interação *Biomphalaria-Schistosoma mansoni*, bem como relatar as estratégias moleculares que estão sendo aplicadas neste tipo de estudo. Sabemos que esta relação é bem complexa e que fatores genéticos tanto do parasito como do hospedeiro estão envolvidos. Contudo, o genótipo do caramujo parece exercer um papel crucial e determinante nesta relação. Em *Biomphalaria glabrata* a resistência do molusco à infecção verificada na maturidade segue a segregação mendeliana e é de caráter dominante, porém há determinados estoques de *B. glabrata* que apresentam um comportamento bem diferente. Neste caso, o caráter resistência parece governado por vários genes. Estudos recentes realizados com *B. tenagophila* do Taim demonstraram que o caráter resistência pode ser determinado por dois genes dominantes e que provavelmente fatores genéticos e ambientais podem modular esta resposta. Neste mesmo capítulo far-se-á a inferência de um possível controle biológico em áreas endêmicas com a introdução da linhagem resistente (*B. tenagophila* do Taim) em áreas onde esta espécie é a única transmissora da doença.

## A RELAÇÃO *Biomphalaria-Schistosoma mansoni*

Ao se discutir a relação *Biomphalaria-Schistosoma mansoni* é fundamental a consideração dos aspectos genéticos que regem esta interação. O sucesso do parasitismo parece depender basicamente da interação de fatores genéticos do parasito, do hospedeiro e também de um ajuste fisiológico entre ambos.

Variações na susceptibilidade de *Biomphalaria glabrata* de diversas áreas geográficas e também diferenças na infectividade das cepas de *S. mansoni* foram relatados por inúmeros autores (Files & Cram, 1949; Kuntz, 1952; Barbosa & Barreto, 1960; Paraense & Corrêa, 1963a).

Estudos pioneiros revelaram que a susceptibilidade de *B. glabrata* a *S. mansoni* era de caráter hereditário e que provavelmente envolveria fatores genéticos (Newton, 1952). Foram realizados vários cruzamentos entre a linhagem susceptível de *B. glabrata* de Porto Rico e a linhagem resistente da Bahia, Brasil. Os descendentes foram testados com a cepa de *S. mansoni* de Porto Rico (PR-1), apresentando taxas de infecção de 0% a 17,4% para F1, de 3% a 58,3% para F2 e uma geração F3 com taxas de 0% a 82%. É preciso salientar que a linhagem *B. glabrata* da Bahia utilizada não é totalmente resistente, pois quando jovem apresenta-se susceptível à infecção. Posteriormente, outros cruzamentos foram realizados e descobriu-se que o caráter resistência do molusco à infecção adquirido na maturidade segue uma segregação mendeliana e de caráter dominante (Richards, 1970). Recentemente, pesquisadores analisaram o fluxo gênico dos alelos envolvidos no caráter resistência (Lewis, Patterson & Grzwacz, 2002), por meio da contagem de indivíduos resistentes e susceptíveis, na geração F1, oriundos de intercruzamentos entre as linhagens parentais resistente (pigmentada) e susceptível (albina) de *B. glabrata*. Os resultados obtidos mostraram que o número de indivíduos F1 resistentes era maior que o número de indivíduos susceptíveis.

A idade é um outro fator que afeta a susceptibilidade em *B. glabrata*: caramujos mais jovens são mais susceptíveis à infecção. A susceptibilidade de *B. glabrata* jovem à infecção por *S. mansoni* parece ser regulada por um conjunto de fatores genéticos ligados a quatro ou mais genes (Richards & Merritt, 1972).

Fatores genéticos do parasito também influenciam a infectividade das cepas, pois os mesmos estoques de caramujos que foram susceptíveis à cepa de *S. mansoni* de Porto Rico (PR-1) apresentaram-se resistentes à cepa de *S. mansoni* de Santa Lúcia (L) (Richards, 1975). O mesmo autor, utilizando diferentes estoques de caramujos e diversas cepas de *S. mansoni*, observou que ocorre grande variação genética na relação entre *B. glabrata* e *S. mansoni* (Richards & Shade, 1987).

Em suma, pode-se dizer que a relação parasito-hospedeiro é uma relação bem complexa. Suspeita-se que variações genéticas do parasito e também do caramujo determinam a susceptibilidade de *B. glabrata*. Alguns autores reafirmam a importância do genótipo do caramujo (Richards, Knight & Lewis, 1992; Knight, Ongele & Lewis, 2000). O genótipo exerce um papel decisivo e determinante nessa relação, apresentando uma variedade de conseqüências como, por exemplo: o desenvolvimento do parasito sem reação em caramujos susceptíveis; atraso no desenvolvimento dos parasitos; reconhecimento, encapsulação e destruição do parasito por meio de hemócitos em caramujos resistentes. Apesar de os primeiros estudos relacionados à susceptibilidade de *B. glabrata* indicarem que a resistência no molusco adulto está associada a um único gene, alguns autores acreditam que há mais de um gene envolvido na eliminação do parasito (Jones et al., 2001).

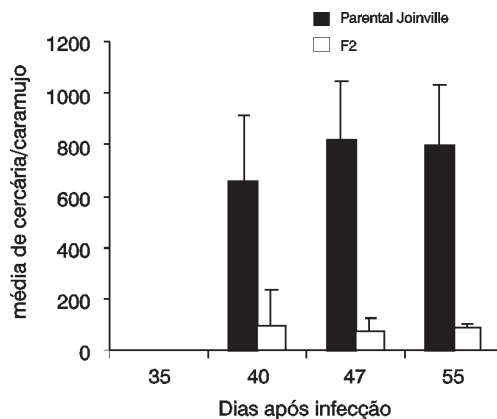
Grande parte dos trabalhos aqui mencionados foram realizados com um estoque de diferentes linhagens isogênicas de *B. glabrata*, com diferentes níveis de susceptibilidade. Os estoques foram estabelecidos

após sucessivas infecções e por autofecundação durante várias gerações, em laboratório (Richards, 1973, 1975). Contudo, pouco se sabe a respeito do gene ou de genes que conferem resistência a *Biomphalaria tenagophila*. Esta espécie vem ampliando consideravelmente sua distribuição pelo território brasileiro, bem como aumentando a sua importância na transmissão da esquistossomose, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país (Paraense & Corrêa, 1987). *B. tenagophila* possui variado grau de resistência, sendo encontradas desde linhagens muito susceptíveis a linhagens totalmente resistentes. Estudos constataram que *S. mansoni* adaptado a *B. glabrata* de Minas Gerais apresentou maior dificuldade para infectar *B. tenagophila* de São Paulo e vice-versa (Paraense & Corrêa, 1963b). Este fato veio a demonstrar a existência de duas linhagens de *S. mansoni*: uma de Belo Horizonte (BH), mais adaptada a *B. glabrata*, e a outra de São José do Campos (SJ), mais adaptada a *B. tenagophila*. A susceptibilidade desta espécie frequentemente está relacionada à cepa geográfica de *S. mansoni*.

*B. tenagophila* de 18 localidades apresentaram taxas de infectividade que variavam de 0% a 91,5% quando expostos à cepa SJ de *S. mansoni* (Paraense & Corrêa, 1978). *B. tenagophila* de Belo Horizonte (MG) e de Cabo Frio (RJ) mostraram-se resistentes à cepa LE e susceptíveis à cepa SJ de *S. mansoni*, sendo que *B. tenagophila* de Cabo Frio apresentou 100% de susceptibilidade (Corrêa, Coelho & Freitas, 1979). Nos vales Paraíba do Sul e Ribeira, áreas dos principais focos endêmicos da esquistossomose em São Paulo, as populações de *B. tenagophila* apresentam índices de susceptibilidade elevados às cepas locais do *S. mansoni*. Isto pode significar um bem-sucedido ajustamento fisiológico das linhagens locais de caramujos àquelas cepas do parasito e vice-versa (Chieffi, 1975).

Para estudos recentes foram usadas duas populações de *B. tenagophila* do Brasil que apresentam pontos extremos com relação à susceptibilidade. Uma é a linhagem albina originária de Joinville, Santa Catarina, altamente susceptível às cepas LE e SJ de *S. mansoni* (Freitas, Boschi & Santos, 1985; Rosa et al., 2005). A outra é procedente da Estação Ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, que tem se mostrado sistematicamente resistente, em todas as idades, frente a diversas linhagens geográficas do parasito, como também a cargas variáveis de miracídios (Santos, Freitas & Correia, 1979; Coelho et al., 2004). A resistência desta linhagem a *S. mansoni* não é resultado de uma incompatibilidade fisiológica entre parasito e hospedeiro, mas sim da existência de um sistema inato de defesa no próprio molusco (Coelho et al., 2004). A linhagem de Taim mostra-se um ótimo modelo para se estudar os aspectos genéticos ligados à resistência a *S. mansoni*. Trabalhos anteriores envolvendo o cruzamento de *B. tenagophila* do Taim com exemplares susceptíveis de *B. tenagophila* de Belo Horizonte (Santos, Freitas & Correia, 1979) e Joinville (Freitas, Boschi & Santos, 1985) mostraram que descendentes F1 resultantes de tais cruzamentos apresentavam baixos índices de susceptibilidade a *S. mansoni*. Atualmente, estão sendo realizados vários cruzamentos entre a linhagem resistente (*B. tenagophila* do Taim) e a susceptível albina (*B. tenagophila* de Joinville). Estudando o fenótipo dos descendentes F1 e F2 oriundo destes cruzamentos, verificou-se que o caráter resistência pode ser determinado por dois genes dominantes e que provavelmente fatores genéticos e ambientais podem modular esta resposta (Rosa et al., 2005). Dos 220 indivíduos F1 infectados com a cepa LE de *S. mansoni*, apenas um eliminava cercárias. A geração F2 obtida do intercruzamento entre indivíduos F1 apresentou índices de susceptibilidade de 5,26% a 8% e uma baixa produção de cercárias quando comparada com a do grupo parental *B. tenagophila* de Joinville (Figura 1).

Figura 1 – Média de cercárias produzidas pelo grupo parental *B. tenagophila* de Joinville e indivíduos susceptíveis da geração F2



Fonte: Rosa et al. (2005).

O marcador molecular, típico da linhagem do Taim, embora não esteja associado à resistência, também é de caráter dominante (Rosa et al., 2004). Este marcador é representado pela presença de uma banda de 350 pares de base da região do ITS do DNA ribossomal mitocondrial detectado pela técnica PCR-RFLP, usando-se a enzima *Ddel* I. Este marcador será de grande importância no monitoramento de um possível controle biológico. A idéia seria a troca do patrimônio genético da cepa susceptível local pelo patrimônio da cepa resistente introduzida. Neste caso, a descoberta de marcadores moleculares associados à resistência, bem como o conhecimento mínimo do genoma da espécie são de suma importância. Várias abordagens moleculares estão sendo usadas pelo grupo, tomando como base os estudos que vêm sendo desenvolvidos com *B. glabrata*.

Neste momento serão apresentadas as estratégias moleculares que estão sendo aplicadas no estudo da interação *B. glabrata-S. mansoni*. Para identificação do gene ou dos genes que controlam o caráter resistência em *B. glabrata*, dois tipos de estudos moleculares estão sendo utilizados (Jones et al., 2001). O primeiro consiste de uma série de técnicas moleculares que têm por objetivo gerar marcadores polimórficos que serão usados no mapeamento genético. O outro tipo de estudo refere-se ao estudo da expressão gênica, mediante isolamento do mRNA.

## MAPEAMENTO GENÉTICO

No contexto da relação *B. glabrata-S. mansoni*, o mapeamento genético possibilitará a localização das regiões que controlam o caráter resistência. Se o fenótipo for transmitido de forma mendeliana, ou seja, um único gene responsável pela característica, o tipo de mapa a ser construído é o de ligação. Por outro lado, se houver mais de um gene controlando tal característica diz-se que a herança é multifatorial ou poligênica. Neste caso, todos os *loci* que têm significativa participação na determinação de uma característica são chamados de *Quantitative Trait Loci* (QTLs). O mapeamento de QTL é bem diferente daquele feito para uma característica monogênica, pois demanda uma estratégia experimental diferente e um volume maior de análises estatísticas. Uma cobertura detalhada da construção de um mapa foge do objetivo. Entretanto, far-se-á uma breve descrição dos dois tipos de mapeamento.

Um mapa de ligação é feito por meio da análise de segregação e da observação da frequência de recombinação entre os marcadores moleculares e a progênie de parentes heterozigotos. O estudo de ligação baseia-se na observação de eventos de recombinação ocorridos entre os cromossomos homólogos durante a meiose, num mecanismo chamado de *crossing-over*. Os marcadores localizados em diferentes cromossomos ou muito distantes num mesmo cromossomo, na maior parte das vezes, têm segregação independente ou mendeliana, diferentemente dos marcadores que estão próximos num mesmo cromossomo, que exibem uma co-segregação. Desta forma, quanto menor seja a distância física que separa dois marcadores num cromossomo, menor será a frequência de recombinação. Um mapa de ligação contém a informação da ordem relativa dos marcadores ao longo do cromossomo, bem como a distância que os separa. Esta distância é medida em função da taxa de recombinação e é chamada de centiMorgan (cM), onde um cM equivale a 1% de recombinação ou, em outras palavras, um único evento de recombinação ocorreu em cem meioses, o que corresponde a 1 Mb no genoma humano e a 1,8 Mb no genoma murino.

Assim, em organismos com reprodução sexuada e passíveis de serem cruzados em laboratório, o estudo de ligação é um eficiente caminho para a localização de seqüências que contribuam na herança dos fenótipos. Os requerimentos básicos para se realizar um estudo de ligação são poucos; o primeiro deles é ter a certeza de que foi realizado um intercruzamento entre dois indivíduos homozigotos, porém diferentes. Os indivíduos F1 são cruzados entre si para gerar indivíduos F2, os quais se recombinaram numa grande variedade de *loci* e serão utilizados nos estudos de ligação. Muitos destes indivíduos serão, então, genotipados para um grande número de marcadores polimórficos. Tal análise permitirá que se determine o modo de herança para cada alelo e também que se calcule a frequência de recombinação entre dois marcadores. A associação entre um alelo herdado e o fenótipo da resistência, por exemplo, pode ser usada para identificar regiões cromossômicas que contenham genes presumivelmente responsáveis por tal fenótipo. Esta estratégia genética, a qual estuda a associação genótipo-fenótipo, não requer, a princípio, qualquer conhecimento prévio dos eventos bioquímicos que regem a interação hospedeiro-parasito.

Enfim, este tipo de mapa é ideal para linhagens de *B. glabrata*, cuja resistência é realmente controlada por um único gene. Há, no entanto, determinados estoques de caramujo em que a resistência parece ser controlada por mais genes. Diante deste cenário, a estratégia genômica para o estudo seria o desenvolvimento de um mapa de ligação de alta resolução, com marcadores moleculares polimórficos que possibilitariam, em seguida, o mapeamento dos QTLs. Este estudo depende das linhagens selecionadas para o primeiro cruzamento. Estas devem ter respostas radicalmente opostas à interação hospedeiro-parasito, ou seja, uma totalmente resistente ao parasito e a outra com alto grau de susceptibilidade. Estas duas linhagens são cruzadas e, então, os indivíduos F1 são intercruzados, gerando uma prole F2 que será genotipada por intermédio de um grande número de marcadores moleculares polimórficos. Uma vez detectados, os QTLs são localizados num mapa genético e a contribuição de cada um para o fenotípico observado é determinada. O mapeamento genético entre um marcador molecular e um QTL e a determinação do seu grau de influência no fenótipo estudado podem ser alcançados de várias formas, incluindo, análises de regressão (dados binários), modelo linear, mapeamento por intervalo genético e pelos métodos bayesianos. Tais métodos permitem estimar todos os parâmetros genéticos associados ao fenótipo de resistência: posição dos QTLs nos cromossomos, quantificação da variação genética fornecida por cada QTL e avaliação das interações entre os QTLs (Hoeschele et al., 1997). O mapeamento por intervalo genético talvez seja a estratégia mais útil neste caso. Para tanto, indivíduos F2 expostos a *S. mansoni* e



comprovadamente resistentes serão genotipados pelo maior número possível de marcadores moleculares polimórficos distribuídos por todo o genoma. Quanto maior for o grau de certeza dos indivíduos F2 resistentes, maior será o intervalo de confiança na localização do QTL em um cromossomo qualquer, avaliado de acordo com valores de LOD (logaritmo das chances). O LOD é um valor calculado a partir da comparação da probabilidade de dois *loci* estarem ligados com uma determinada frequência de recombinação *versus* a probabilidade de que os dois *loci* não estejam ligados (frequência de recombinação igual a 50%, ou seja, segregação independente). Esta estratégia não requer a existência de marcadores proximamente ligados ao caráter de interesse e o intervalo genético pode ser melhorado à medida que novos marcadores forem selecionados e genotipados, ou seja: os dados são aditivos.

### Marcadores Moleculares

A construção dos dois tipos de mapas só é possível com a utilização de marcadores polimórficos gerados por meio de várias técnicas moleculares. Um dos usos mais importantes de marcadores de DNA não é seguir genes particulares de interesse em análises de segregação, mas, ao em vez disso, fornecer 'âncoras' que estão espaçadas em distâncias uniformes ao longo de cada cromossomo, no genoma. Juntos, esses *loci* âncoras podem ser usados para estabelecer mapas que podem ser usados para mapear rapidamente qualquer novo *locus* que seja de real interesse. Se o número de *loci* âncoras for suficiente, será necessário apenas um único cruzamento para se poder posicionar um determinado *locus* no mapa. O objetivo da existência desses *loci* é marcar pontos particulares ao longo da molécula de DNA em cada um dos cromossomos, num genoma. Os *loci* cujas posições são conhecidas e que podem ser utilizados em análises de ligação são chamados de marcadores genéticos.

Existem alguns critérios que definem *loci* âncoras perfeitos:

- o primeiro diz que o nível de polimorfismo deve ser extremamente grande, a ponto de existirem grandes chances de que dois cromossomos homólogos quaisquer numa espécie carreguem alelos diferentes;
- o segundo diz que a identificação desses *loci* deve ser fácil, de modo que o estudo em qualquer espécie permita a identificação de um conjunto apropriado de âncoras.
- por último, os *loci* devem ser abundantes, fáceis e rápidos de serem tipados, mesmo num grande número de indivíduos.

### MICROSSATÉLITES OU SEQÜÊNCIAS DE REPETIÇÕES SIMPLES

No início dos anos 1990 surgiu um elemento genômico com um conteúdo altamente polimórfico, presente em alta densidade por todo o genoma de vários organismos, tanto os vertebrados como os invertebrados, de fácil análise e rápida tipagem: os microssatélites (Rhodes, 1998). O genoma humano e o de camundongo estão repletos de microssatélites, que nada mais são do que repetições simples em *tandem* de um pequeno fragmento de um a seis nucleotídeos. Na verdade, o fragmento de um a quatro nucleotídeos caracteriza a maioria dos microssatélites mapeados, cujo tamanho, segundo alguns autores, pode ser variável. Alguns definem como repetições em *tandem* de 2-8 pares de bases, outros como repetições



de 1-6 pb ou mesmo 1-5 pb. A maioria dos microssatélites está localizada dentro de regiões não codificantes ou mesmo seqüências intergênicas e correspondem a marcadores anônimos.

O termo *simple sequence length polymorphisms* – SSLP, polimorfismo no comprimento de seqüências simples é utilizado para definir os marcadores microssatélites. Sugere-se um tamanho mínimo total de oito nucleotídeos para uma seqüência microssatélite e adota-se uma definição estrita de que eles contêm entre dois e seis nucleotídeos de comprimento nas unidades repetitivas.

Já foram identificados microssatélites contendo todas as combinações de nucleotídeos, sendo geralmente a classe do dímero  $(CA)_n(GT)_n$  a mais encontrada nos genomas. O número de repetições em cada sítio cromossômico é estável dentro de uma linhagem isogênica, mas é variável entre as linhagens, de modo que o comprimento pode ser usado como um marcador molecular conhecido como um SSLP. Essas seqüências simples são flanqueadas por segmentos de DNA específicos para cada uma. Desse modo pode-se amplificar cada uma das seqüências, utilizando-se iniciadores específicos para as seqüências flanqueadoras únicas, por uma reação em cadeia da polimerase (PCR). De fato, sem a PCR, a maioria dos microssatélites seria inútil como marcadores genéticos. A variação alélica dos microssatélites está relacionada ao número de unidades repetitivas presentes num arranjo em *tandem*. O maior problema no uso dos microssatélites é que, para cada espécie para qual se deseja construir um mapa de ligação se terá que, *a priori*, isolar novos microssatélites, pois, na maior parte das vezes, eles são espécie-específicos. Entretanto, em várias ocasiões microssatélites isolados para uma determinada espécie puderam ser utilizados em outras espécies taxonomicamente próximas. Vários dos microssatélites que foram isolados a partir do genoma de *B. glabrata* (Campbell et al., 2000) puderam ser amplificados na espécie africana *B. pfeifferi*, e o contrário também pôde ser feito. Marcadores tipo microssatélite mostraram que populações de *B. glabrata* pertencentes ao lago de Valência (Venezuela) apresentam maior diversidade genética intrapopulacional do que interpopulacional, sugerindo uma influência da conectividade entre populações nos níveis de diversidade genética (Malvárez et al., 2002).

## MARCADORES ALEATÓRIOS

Vários mapas de ligação foram construídos usando-se marcadores aleatórios como, por exemplo, os *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (Rapid) – polimorfismo de DNA amplificado ao acaso. Esta metodologia baseia-se na obtenção de polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente. Sendo aleatória, não requer o conhecimento prévio das seqüências de DNA e conseqüentemente não necessita de iniciadores específicos. Estes polimorfismos são produzidos pela amplificação do DNA pela PCR, usando-se iniciadores pequenos sob condições de baixa estrigência de anelamento (Willians et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990). Um único iniciador é utilizado em cada reação e os fragmentos obtidos são específicos para este iniciador, sendo decorrentes de ligações distribuídas ao acaso dentro do genoma. A ligação dos iniciadores a múltiplos sítios do genoma permite a amplificação de segmentos anônimos. Devido à baixa estrigência, é baixo o seu poder de reprodutibilidade.

Recentemente, dois marcadores (1.2 Kb e 1.0 kb) foram identificados, com a técnica de Rapid, em uma linhagem BS-90 resistente de *B. glabrata* (Knight et al., 1999). Analisando o genótipo de 54 indivíduos resistentes da geração F2 com os iniciadores OPM-04 e OPZ-11, foi possível detectar a presença de dois fragmentos. O fragmento de 1.2 kb estava presente em 90% dos descendentes resistentes; já o fragmento de 1.0 Kb estava presente em todos os indivíduos resistentes analisados. Verificou-se que estes marcadores

estavam ausentes em todos os caramujos susceptíveis da geração F2. Análises da seqüência dos marcadores de 1.2 Kb e 1.0 Kb mostraram que eles correspondem a regiões repetidas do genoma do caramujo e uma consulta feita no banco de dados revelou que apenas o marcador de 1.0 Kb possuía homologia com retrovírus.

A análise de Rapd no estudo de *B. tenagophila* susceptíveis e resistentes a *S. mansoni* demonstrou variações genéticas entre as duas linhagens, contudo não foi detectado nenhum marcador de resistência entre os indivíduos analisados (Abdel-Hamid et al., 1999).

Um outro tipo de marcador aleatório é chamado de AFLP, que combina a PCR com RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição). Basicamente, o DNA genômico é digerido com duas enzimas de restrição (uma cortando raramente o genoma e outra mais comum), seguido da ligação de adaptadores às extremidades do DNA geradas pelas digestões, os quais são amplificados pela PCR usando iniciadores que contêm a seqüência comum do adaptador mais 1-3 nucleotídeos arbitrários. Somente a população de fragmentos de restrição nas quais as bases sejam complementares aos nucleotídeos arbitrários será amplificada. Da mesma forma que o Rapd, o AFLP não requer o conhecimento prévio das seqüências estudadas, porém nesse caso as condições de amplificação são mais estridentes e os resultados obtidos são facilmente reproduzidos.

### EXPRESSED SEQUENCE TAGS (EST) – ETIQUETAS DE SEQÜÊNCIAS TRANSCRITAS OU EXPRESSAS

As EST são seqüências pequenas (< 750 pb) geradas a partir de bibliotecas de cDNA (Adams, Kelley & Gocayne, 1991). Em geral, iniciadores são desenhados a partir das extremidades 5' e 3' dos cDNAs e cada par destes corresponde a um gene. Os dados de EST são versáteis e têm sido aplicados na identificação de genes, na análise comparativa de seqüências (Makalowski & Boguski, 1998), no mapeamento gênico comparativo e identificação de genes candidatos a algum fenótipo estudado (Scharf, 1998), na anotação da seqüência genômica (Bailey, Searls & Overton, 1999; Jiang & Jacob, 1999), no desenvolvimento de *microarray* (Schena et al., 1999) e no desenvolvimento de recursos de mapa baseados em genes (Schuler et al., 1996). Pesquisadores demonstraram a ocorrência de RFLP entre caramujos resistentes e susceptíveis mediante o uso de ESTs como sondas moleculares (Knight et al., 1998). Duas bibliotecas de cDNA foram construídas a partir dos hemócitos de uma linhagem resistente de *B. glabrata* exposto e não exposto a *S. mansoni* (Raghavan et al., 2003). A partir destas duas bibliotecas, o grupo gerou 1.025 ESTs. Algumas classes gênicas como, por exemplo, ubiquitina, ferritina, citocromo p450 foram comuns às duas bibliotecas. Naquela biblioteca elaborada a partir de hemócitos expostas a *S. mansoni* foi encontrada uma abundância de transcritos envolvidos com os processos de transcrição e tradução, como as proteínas ribossomais e proteínas de iniciação da transcrição. Porém, também foram encontrados transcritos únicos como o fator de agregação amebóide, mucina e transposase. Já na biblioteca construída a partir dos caramujos não expostos, os transcritos mais proeminentes foram os citocromos oxidase, citocromo b, glicoproteína e proteínas neuronais, entre outros.

### SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) – POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO

Um último tipo de marcador que vem sendo utilizado naqueles genomas cujas seqüências são quase ou totalmente conhecidas é o *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) – polimorfismo de nucleotídeo único.

Os SNPs correspondem a diferenças de uma única base numa determinada população. Estes marcadores são abundantes, estáveis e os que mais variam no genoma. Eles são responsáveis por 90% da variação da seqüência em humanos e ocorrem em, aproximadamente, um em cada mil pares de bases em cada dois indivíduos (Wang et al., 1998). Cada SNP tem apenas dois alelos possíveis, comparado aos microsatélites que são hipervariáveis. Entretanto, sua abundância e densidade são tão altas que os tornam potencialmente mais informativos que qualquer outro marcador molecular.

## O MAPA GENÉTICO E A PROCURA DE GENES DA RESISTÊNCIA

Assim que uma região cromossômica contendo um ou mais QTL é identificada, a estratégia da clonagem posicional pode ser evocada para se tentar chegar ao gene. A estratégia da clonagem posicional (Cargill et al., 1999), também chamada genética inversa ou reversa (Collins, 1992; Ruddle, 1984; Orkin, 1986), consiste em se isolar um gene identificado unicamente por um fenótipo, por exemplo o caráter resistência, por meio da identificação do menor fragmento de DNA que o contenha e, em seguida, identificarem-se, nesse fragmento, suas seqüências codificadoras. Para essa estratégia, *a priori*, não se faz necessário um conhecimento prévio do produto do gene procurado nem do tecido em que ele esteja expresso. Entretanto, fica claro que, quanto menos informações se tiver do gene procurado, mais a tarefa da clonagem promete ser difícil e longa.

A clonagem posicional de um gene acontece em três etapas. Em um primeiro momento, se efetua o mapeamento genético do fenótipo estudado, ou seja, se localiza o cromossomo que carrega o locus responsável pelo caráter. Para tanto, na grande maioria das vezes, precisa-se efetuar cruzamentos especiais para se alcançar tal objetivo. Esse cruzamento envolve a linhagem na qual o fenótipo esteja segregando e uma outra, a fim de se mobilizar um alto grau de polimorfismo, essencial ao trabalho de mapeamento. Nessa fase, tenta-se encontrar os dois marcadores mais próximos do locus mórbido e calcula-se a distância genética (centiMorgan, cM) que os separa.

Desde que se tenha conseguido restringir ao máximo o intervalo genético que contenha a mutação, começa, então, o que é chamado de 'marcha sobre o cromossomo'. Nessa etapa, irá se construir o mapa físico da região cromossômica estudada. Para tanto, fragmentos de DNA clonados nos BAC ou YAC são alinhados uns após os outros, formando o que se costuma denominar de um *contig* da região. A caracterização desse *contig* define a construção do mapa físico, em que as distâncias entre os marcadores serão medidas em pares de bases de nucleotídeos. As extremidades do *contig* correspondem aos dois marcadores que englobam o locus responsável pelo fenótipo, definido pelo estabelecimento do mapa genético concluído na primeira etapa do trabalho de clonagem posicional.

Enfim, passa-se à fase de recuperação das seqüências codificadoras contidas no DNA do *contig*. Essas seqüências são, em seguida, caracterizadas para que se possa definir o perfil de um gene que será, então, o gene candidato.

Uma outra estratégia no intuito de isolar o ou os genes envolvidos na resistência do caramujo, o qual se chamará de estratégia alternativa, refere-se ao estudo da expressão gênica mediante o isolamento do mRNA. Neste caso, o mapeamento genético não seria a primeira etapa do trabalho, mas um complemento deste.

## ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA

Vários métodos podem ser utilizados no estudo comparativo da expressão gênica como, por exemplo:

- técnicas de hibridização subtrativa;
- seqüenciamento;
- análise seriada da expressão gênica (Sage);
- *differential display* (DD);
- *cDNA representational difference analysis* (cDNA RDA);
- *microarray*.

Pode-se classificar estes métodos entre 'baseados na PCR' e os 'não baseados na PCR', sendo estes últimos mais onerosos, pois além de consumirem mais material, são mais demorados. Neles pode-se incluir a hibridização e a clonagem subtrativa, o *Northern blot* e a sondagem de bibliotecas de cDNA. Apesar destas dificuldades alguns pesquisadores conseguiram obter resultados interessantes na busca dos genes envolvidos com o caráter resistência. Pesquisadores construíram uma biblioteca de cDNA enriquecida com seqüências de uma linhagem de *B. glabrata* resistente (Miller et al., 1996). Por intermédio de hibridizações sucessivas com material de indivíduos resistentes e susceptíveis, seguidas da clonagem do cDNA não hibridizado, eles conseguiram isolar dois transcritos que mostraram expressão elevada nos caramujos resistentes.

Duas técnicas de análise diferencial da expressão gênica são baseadas na PCR: cDNA RDA e DD.

Resumidamente, a RDA envolve a síntese de cDNA a partir de duas populações de RNA (controle e testado ou experimental). Em seguida, as duas classes de RNA são digeridas, aos fragmentos gerados pela ação das enzimas de restrição são ligados adaptadores e segue-se uma PCR com iniciadores complementares às seqüências dos adaptadores. As duas populações de cDNA são hibridizadas em presença de um excesso da população-controle e, então, reamplificadas para aumentar a concentração do material proveniente da população de cDNA testada. Da mesma forma que na hibridização subtrativa, o RDA também só possibilita a comparação de duas classes de mRNA, ou seja, resistente e susceptível. Não se pode fazer um estudo comparativo envolvendo vários tecidos, em diferentes períodos de desenvolvimento, de linhagens resistentes e susceptíveis não expostas e expostas ao parasito etc. Alguns desses problemas puderam ser resolvidos com o desenvolvimento de técnicas baseadas na comparação diferencial da expressão gênica como, por exemplo, a técnica do *differential display* detalhada a seguir.

Técnicas de perfil de RNA como *differential display* e PCR utilizando iniciadores arbitrários proporcionam análises mais detalhadas de expressão gênica em caramujos. Atualmente esta técnica vem sendo muito explorada para se investigar a interação parasito-hospedeiro (Liang & Pardee, 1992). Ela consiste primeiramente em converter o mRNA de dois ou mais indivíduos em cDNA por meio de uma transcriptase reversa. Nesta fase utiliza-se também um iniciador oligo (dT) modificado que tem um único nucleotídeo ou um dinucleotídeo diferente na extremidade 3', fazendo com que ele se ligue à cauda poli (A). No segundo passo, utiliza-se um outro iniciador de seqüência curta e arbitrária, o qual será o responsável pela amplificação dos fragmentos de cDNA. Em seguida os padrões de amplificação resultantes são projetados deliberadamente para produzirem um espectro de bandas, após serem submetidos a uma

eletroforese em um gel de poliacrilamida longo. Diferenças nas bandas de amplificação entre as fontes de RNA comparadas indicam expressão diferencial. Apesar de o método tender a indicar resultados falso-positivos, pode ser útil na clonagem de genes expressos diferencialmente em duas ou mais populações analisadas. Com esse objetivo, bandas específicas de PCR presentes em uma amostra, mas ausentes em outra, são isoladas do gel e o DNA é submetido a ciclos adicionais de PCR. Posteriormente estas bandas podem ser seqüenciadas ou submetidas a hibridização por substrato.

O *differential display* tem sido utilizado para se identificar mudanças na expressão gênica de *B. glabrata* após a infecção com *S. mansoni*. O primeiro trabalho realizado neste sentido foi com a cepa 1.778 de *B. glabrata* (Belo Horizonte), que apresenta 70% de resistência quando expostos a *S. mansoni* (Lockyer et al., 2000). Após se extrair o RNA total do ovotéstis, manto e nefrídio anterior do grupo-controle (caramujos que não foram infectados) e do grupo de caramujos com quatro e 24 horas de infecção e transformá-los em cDNA e compará-los, observou-se que havia uma mudança de expressão num determinado fragmento. Este fragmento foi então seqüenciado e o mesmo apresentou homologia com o citocromo cyp450. Entretanto, este mesmo gene apresentou baixa regulação após 24 horas de infecção em vários tecidos. Para se confirmar a expressão diferencial do cyp450 foi realizada uma RT-PCR semiquantitativa (*semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction*). Desta forma, foi observado que realmente ocorre uma expressão diferencial entre os indivíduos infectados e não infectados. O citocromo P450s, conhecido como monoxigenases inespecíficas, faz parte de uma grande família de proteínas hemetiolatos. Estas estão envolvidas nos metabolismos oxidativos de esteróides, ácidos graxos, vitaminas e prostaglandinas. Em casos humanos de esquistossomose mansoni nota-se um decréscimo nos níveis de cyp450 no fígado (Habid et al., 1996); no entanto, não foi elucidada sua função em *B. glabrata*. Vários fragmentos de perfis de DD, cuja expressão aparentemente foi alterada após exposição ao miracídio, foram detectados por RT-PCR (Knight, Ongele & Lewis, 2000). Essas seqüências tiveram homologia com seqüências já depositadas no GenBank e foram uma metaloprotease, uma transcriptase reversa e uma  $\beta$ -integrina. Com o intuito de realizar um estudo mais detalhado a respeito dos genes que se expressaram após a infecção, Knight, Ongele & Lewis (2000) monitoraram todo o período de infecção desde as primeiras horas até o final do período pré-patente. Desta forma foi possível observar que alguns transcritos, visualizados em formas de bandas, desapareciam logo após a exposição ao miracídio, enquanto outras bandas eram expressas durante outros estádios do desenvolvimento do parasito intramolusco. Após o período pré-patente, as 22 bandas que foram expressas diferenciadamente foram clonadas e a seguir processadas com sondas específicas do parasito e do caramujo. Parte das bandas que foram clonadas hibridizou-se tanto com o DNA do caramujo como também com o do parasito. Uma das bandas que apresentava 370 bp e que foi expressa na segunda semana de infecção apresentou 82% da sua seqüência idêntica ao fator de iniciação da tradução *elF-6*. O papel deste gene na interação parasito-hospedeiro está sendo estudado.

O *differential display* foi também utilizado para se identificar diferenças na regulação gênica de hemócitos isolados de uma linhagem resistente de *B. glabrata* (BS-90) expostos e não expostos a *S. mansoni* (Miller et al., 2001). Analisando o perfil de cDNA entre hemócitos de caramujos infectados e não infectados observou-se que 87 bandas foram expressas diferencialmente. Dessas, 65 bandas foram clonadas e usadas como sondas, com base na metodologia de *Southern blot*, para mostrar se realmente as seqüências correspondiam ao genoma do caramujo. Análises da seqüência de DNA mostraram que a maioria das seqüências clonadas



eram desconhecidas. Alguns clones apresentavam similaridade com proteína pGI humana, proteínas envolvidas na síntese de lipopolissacarídeos e glicoproteínas ricas em histidina/prolina (HRGP). O clone denominado BRIDD58 foi o único que apresentou uma forte similaridade para Tn5 transposase de *E. coli*. O papel desta enzima no caramujo não está bem claro; sabe-se que em bactérias ela está envolvida na transposição e mutação. Um outro trabalho feito também com hemócitos de caramujos susceptíveis e resistentes, expostos e não expostos a *S. mansoni*, isolou vários fragmentos diferentemente expressos (Schneider & Zelck, 2001). A maior parte das seqüências isoladas pertencia a classes de RNA ribossomais. Entretanto, seis delas (serina/treonina quinase, mioglobina, peroxidase, molécula de adesão leucicitária, defensivo neurotrófico e glicosidase) parecem ser interessantes e serão analisadas em detalhes, futuramente.

## ABORDAGENS BASEADAS NA SEQÜÊNCIA

Progressos na caracterização do genoma de *B. glabrata* têm sido feitos com geração de etiquetas de seqüência expressas (ESTs) a partir de bibliotecas de cDNA. Isto rapidamente gerou um banco de dados contendo seqüências e fontes de clones consideráveis, sendo valiosa fonte de pesquisa. Muitas das ESTs identificadas são novas, impedindo a elucidação de sua função somente por homologia com outros genes caracterizados em diferentes organismos. Um uso potencial deste recurso constará na comparação *in silico* de bancos de dados de ESTs para identificação de transcritos diferentemente expressos, sendo que este método necessitará de dados representativos extraídos de cDNAs de diversos tecidos amostrados, além de um banco de dados específicos de cDNAs expressos em infecções parasito-específicas.

Uma segunda abordagem na investigação da expressão de mRNAs do caramujo seria a Sage, que é mais útil para estudos de perfil de expressão de genes totalmente seqüenciados e permite uma análise simultânea de seqüências de diferentes tecidos. A técnica envolve a geração de etiquetas de seqüências únicas para cada cDNA. Estas etiquetas são então ligadas em longos concatâmeros e seqüenciadas. Estas seqüências são longas o suficiente para identificar cada gene específico no banco de dados. Quanto maior o nível de expressão de um gene, maior sua representação nos dados disponíveis. Populações diferentes de cDNAs podem ser comparadas para se determinar diferenças absolutas e relativas na expressão dos genes de interesse. Sage é um método de alto rendimento, mas que requer grandes quantidades de mRNA (2,5-5,0 ug poli A), embora novos protocolos tenham reduzido esta quantidade. A maior desvantagem deste método é que ele permite a análise apenas de EST ou genes seqüenciados, tornando-o um método inapropriado para a análise da expressão gênica no caramujo. A técnica se tornará uma real possibilidade à medida que mais seqüências enriquecerem o banco de dados para *B. glabrata*.

Como se pode observar, inúmeras estratégias moleculares têm sido utilizadas para identificar regiões, no genoma do caramujo, associadas com o fenótipo resistência; futuramente, outras tecnologias, tais como *microarray*, proteoma, espectrometria de massa também serão aplicadas na investigação da interação *Biomphalaria-S. mansoni*.

## PERSPECTIVAS

Estudos da dinâmica populacional entre populações resistentes e susceptíveis de *B. tenagophila* submetidas ou não à pressão de *S. mansoni* mostrou que houve um predomínio da linhagem resistente e

que a população susceptível mostrou-se mais sensível à presença do parasito, apresentando elevadas taxas de mortalidade (Rosa et al., 2006). Visto que a transmissão do caráter resistência em *B. tenagophila* é dominante e tomando como base os mais de 27 anos de estudo com a linhagem resistente *B. tenagophila* Taim, o grupo de pesquisadores neste assunto propõe um modelo de controle biológico para controle da esquistossomose. A idéia seria a introdução em larga escala da linhagem resistente em áreas onde *B. tenagophila* seja a principal espécie transmissora. Como *Biomphalaria* tem preferência pela fecundação cruzada (Paraense, 1955), é de se esperar que, após a redução drástica da população local do foco de transmissão, por exemplo após o uso de moluscicida, a introdução em larga escala da linhagem Taim resistente forçará os sobreviventes ao cruzamento com a linhagem introduzida. Os descendentes terão o desejado caráter dominante de resistência ao parasito e herdarão também a capacidade adaptativa ao ambiente local de seus ascendentes locais. A presença de *S. mansoni* nos caramujos susceptíveis representa uma parasitose com efeitos devastadores, pois causa alta mortalidade nos caramujos infectados e diminui a postura de ovos, constituindo-se assim um elemento de seleção natural altamente negativo para os caramujos potencialmente transmissores da doença. A expectativa é que, ao longo do tempo, por pressão seletiva da ação do próprio *S. mansoni*, haja a predominância de exemplares com o patrimônio genético da resistência ao trematódeo. Outro aspecto importante a ser levantado é o fato de ter se conseguido um marcador molecular que é típico da linhagem do Taim e servirá para demonstrar o sucesso da inserção do patrimônio genético da linhagem do Taim na população, após intervenção.

Um convênio foi firmado entre o Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo (Sucen). Este projeto já está em andamento nos municípios de Caraguatatuba e Bananal, no estado de São Paulo, e foi autorizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (número da autorização 175/DIF/Difap/Ibama).

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, A. H. Z. et al. Genetic variation between susceptible and non-susceptible snails to *Schistosoma mansoni* infection using random amplified polymorphic DNA analysis (RAPDs). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 41: 291-295, 1999.
- ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M. & GOCAYNE, J. D. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252: 1651-1656, 1991.
- BAILEY JR., L. C.; SEARLS, D. B. & OVERTON, G. C. Analysis of EST-driven gene annotation in human genomic sequence. *Genome Research*, 8: 362-376, 1999.
- BARBOSA, F. S. & BARRETO, A. C. Differences in susceptibility of Brazilian strains of *Australorbis glabratus* to *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*, 9: 137-140, 1960.
- CAMPBELL, G. et al. Molecular evidence supports an Africa affinity of the neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 267: 2.351-2.358, 2000.
- CARGILL, M. et al. Characterization of single polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics*, 22: 231-237, 1999.



- CHIEFFI, P. P. Susceptibilidade a infecção por *Schistosoma mansoni* de cepas de *Biomphalaria tenagophila* originárias dos estados de São Paulo e Paraná. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 17: 92-96, 1975.
- COELHO, P. M. Z. et al. *Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* interaction: current knowledge and perspectives for its application on the control of schistosomiasis mansoni. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, supl. 1: 109-111, 2004.
- COLLINS, P. Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nature Genetics*, 1: 3-6, 1992.
- CORRÊA, M. C. R.; COELHO, P. M. Z. & FREITAS, J. R. Susceptibilidade de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* a duas cepas de *Schistosoma mansoni* – (LE – Belo Horizonte – MG e SJ – São José dos Campos – SP). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 21: 72-76, 1979.
- FILES, V. S. & CRAM, E. B. A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*, 35: 555-560, 1949.
- FREITAS, J. R.; BOSCHI, M. B. & SANTOS, M. B. L. Suscetibilidade de 'híbridos' de *Biomphalaria tenagophila* à cepa LE (BH) do *Schistosoma mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 1: 6-12, 1985.
- HABID, S. L. et al. Influence of *Schistosoma mansoni* infection on carcinogen-metabolising capacities and in vitro aflatoxin B1 metabolism in human liver. *Oncology Reports*, 3: 769-773, 1996.
- HOESCHELE, I. et al. Advances in statistical methods to map quantitative trait loci in outbred populations. *Genetics*, 147: 1.445-1.457, 1997.
- JIANG, J. & JACOB, H. J. E. B. EST: an automated tool using expressed sequence tags to delineate gene structure. *Genome Research*, 8: 268-275, 1999.
- JONES, C. S. et al. Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata-Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling. *Parasitology*, 123: 181-196, 2001.
- KNIGHT, M.; ONGELE, E. & LEWIS, A. F. Molecular studies of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*, 30: 525-541, 2000.
- KNIGHT, M. et al. Expressed sequence tags (ESTs) of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*: use in the identification of RFLP markers. *Malacology*, 39: 175-182, 1998.
- KNIGHT, M. et al. The identification of markers segregations with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Proceedings National Academy of Sciences United State of America*, 96: 1.510-1.515, 1999.
- KUNTZ, R. E. Exposure of planorbid snails from the Western Hemisphere to miracidia of the Egyptian strain of *Schistosoma mansoni*. *Proceeding of Helminthology Society of Washington*, 19: 9-15, 1952.
- LEWIS, A. F.; PATTERSON, C. N. & GRZWACZ, C. Parasite- susceptibility phenotypes of F1 *Biomphalaria glabrata* progeny derived from interbreeding *Schistosoma mansoni*-resistant and susceptible snails. *Parasitology Research*, 89: 98-101, 2002.
- LIANG, P. & PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257: 967-971, 1992.

- LOCKYER, A. E. et al. Use of differential display to detect changes in gene expression in the intermediate snail *Biomphalaria glabrata* upon infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 20: 399-407, 2000.
- MAKALOWSKI, W. & BOGUSKI, M. S. Evolutionary parameters of the transcribed mammalian genome: an analysis of 2820 orthologous rodent and human sequences. *Proceedings National Academy of Sciences United State of America*, 95: 9.407-9.412, 1998.
- MALVÁREZ, M. et al. Fine- Scale population structure and dispersal in *Biomphalaria glabrata*, the intermediate snails host of *Schistosoma mansoni*, in Venezuela. *Molecular Ecology*, 11: 879-889, 2002.
- MILLER, A. N. et al. *Schistosoma mansoni*: use of the subtractive cloning strategy to search for RFLPs in parasite resistant *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, 84: 420-428, 1996.
- MILLER, N. A. et al. Differential gene expression in haemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata* effects of *Schistosoma mansoni* infection. *International Journal for Parasitology*, 31: 687-696, 2001.
- NEWTON, W. L. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Experimental Parasitology*, 2: 242-257, 1952.
- ORKIN, S. H. Reverse genetics and human disease. *Cell*, 47(6): 845-850, 1986.
- PARAENSE, W. L. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 53: 277-284, 1955.
- PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 5: 15-22, 1963a.
- PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 5: 23-29, 1963b.
- PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*, 64: 822-826, 1978.
- PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Probable extension of schistosomiasis mansoni to southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82: 577, 1987.
- RAGHAVAN, N. et al. Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata*: hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 126: 181-191, 2003.
- RHODES, M. A high-resolution microsatellite map of the mouse genome. *Genome Research*, 8(5): 531-542, 1998.
- RICHARDS, C. S. Genetic studies of a molluscan vector of schistosomiasis. *Nature*, 227: 806-810, 1970.
- RICHARDS, C. S. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). *Malacology*, 6: 199-202, 1973.
- RICHARDS, C. S. Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different strains of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 70: 231-241, 1975.
- RICHARDS, C. S. & MERRITT JR., J. W. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 21: 425-434, 1972.

- RICHARDS, C. S. & SHADE, P. C. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* infection. *The Journal of Parasitology*, 73: 1146-1151, 1987.
- RICHARDS, C. S.; KNIGHT, M. & LEWIS, F. A. Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology Today*, 8: 171-174, 1992.
- ROSA, F. M. et al. Dominant character of the molecular marker of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Planorbidae) strain, resistant to *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 85-87, 2004.
- ROSA, F. M. et al. *Biomphalaria tenagophila*: dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* and descendants of cross-breeding between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(1): 19-23, 2005.
- ROSA, F. M. et al. *Biomphalaria tenagophila*: dynamics of populations of resistant and susceptible strains to *Schistosoma mansoni*, with or without pressure of the parasite. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, supl. 1: 247-251, 2006.
- RUDDLE, F. H. The William Allan memorial award address: reverse genetics and beyond. *American Journal of Human Genetics*, 36: 944-953, 1984.
- SANTOS, M. B. L.; FREITAS, J. R. & CORREIA, M. C. R. Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* do Taim, RS, Cabo Frio, RJ, e Belo horizonte, MG. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*; 21(6): 281-286, 1979.
- SCHARF, J. M. Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nature Genetics*, 20: 83-86, 1998.
- SCHEINA, M. et al. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. In: MARRA, M. et al. An encyclopedia of mouse genes. *Nature*, 21: 191-194, 1999.
- SCHNEIDER, O. & ZELCK, U. E. Differential display analysis of hemocytes from schistosome-resistant and schistosome-susceptible intermediate hosts. *Parasitology Research*, 87:489-491, 2001.
- SCHULER, G. D. et al. A gene map of the human genome. *Science*, 274: 540-546, 1996.
- WANG, D. G. et al. Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280: 1.077-1.082, 1998.
- WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleid Acids Research*, 18: 7.213-7.218, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleid Acids Research*, 18: 6.531-6.535, 1990.