

## SCHISTOSOMA MANSONI: INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS ATRAVÉS DA ORELHA E QUANTIFICAÇÃO DO PARASITISMO NA PELE (1)

Sílvia E. GERKEN (2), Aparecida F. S. OLIVEIRA (3), Rodrigo CORREA-OLIVEIRA (3)  
& Tomaz A. MOTA-SANTOS (3)

### RESUMO

No presente trabalho, desenvolveu-se método de infecção de camundongos através da orelha e de recuperação de esquistossômulos resultantes dessas infecções. Cerca de 80% das cercárias postas em contacto com orelhas de camundongos penetraram. Destas, 30% foram recuperadas como vermes adultos, do sistema porta. Da pele (das orelhas) as maiores recuperações de esquistossômulos ocorreram nos dois primeiros dias após a infecção. Os parasitas permaneceram nesse sítio por dois dias. No terceiro dia, os parasitas foram recuperados tanto da pele como dos pulmões. A partir do 4.º dia, foi predominante a recuperação de esquistossômulos ao nível dos pulmões. Do total de parasitas que potencialmente atingiriam o sistema porta, proporção elevada (73-80%) pode ser recuperada da pele, no segundo dia após a infecção, como esquistossômulos.

Revelando-se apropriadas ao acesso, à migração no hospedeiro e às técnicas de recuperação de parasitas, sugere-se que orelhas de camundongos podem ser utilizadas como sítio de infecção para estudos que visem a análise parasitológica dos eventos iniciais da infecção em animais normais ou imunes.

**UNITERMOS:** Esquistossomose experimental do camundongo; *S. mansoni* — Infestação experimental através da orelha; Recuperação de esquistossômulos.

### INTRODUÇÃO

Avaliação da imunidade de camundongos ao *Schistosoma mansoni* tem sido determinada comparando-se a recuperação de parasitas provenientes de uma infecção em animais já parasitados (infecção secundária) com a recuperação de parasitas de uma infecção provocada em animais normais (infecção primária). Com maior freqüência, infecções para avaliação de imunidade são feitas através da cauda<sup>4,5,16</sup> ou do abdômen<sup>14,18,19,20</sup> e as recuperações dos parasitas delas resultantes efetuadas dos pulmões<sup>5,4,14,18,22</sup> ou do sistema porta<sup>4,16,19</sup>.

Em 1980, SMITHERS & GAMMAGE<sup>19</sup>, após incubarem com colagenase fragmentos de pele parasitada, verificaram redução do número de esquistossômulos recuperados da pele do abdômen de camundongos imunes 48 horas após a infecção secundária. Manifestação tão precoce de resistência a reinfeção tornou relevante o estudo da imunidade adquirida nos períodos iniciais da infecção secundária e, em consequência, tornou também necessário o desenvolvimento de metodologias de infecção experimental e de recuperação quantitativa de

(1) Pesquisa com auxílio financeiro do CNPq, FIDE (403809/82 — 403806/82) e FINEP (n.º 433)

(2) Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG

(3) Departamento de Bioquímica-Imunologia, ICB/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

Correspondência: Sílvia Elizabeth Gerken

Departamento de Parasitologia — ICB/UFMG

Caixa Postal 2486 — 30161 Belo Horizonte, MG, Brasil

parasitas da pele, para facilitarem o estudo dos eventos que ocorram nesse local imediatamente após o hospedeiro ter sido exposto às formas infectantes.

Neste trabalho, foram investigados alguns aspectos da infecção experimental de camundongos normais através da orelha, assim como a quantificação do parasitismo nesse sítio, com objetivo de desenvolver essas metodologias.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cercárias

Cercárias do *S. mansoni* (cepa LE, Belo Horizonte, MG, Brasil) foram obtidas de *Biomphalaria glabrata* mantidos em laboratório e concentradas segundo técnica de GAZZINELLI et al.<sup>8</sup>.

### Infecção de camundongos

Foram utilizados camundongos C57 BL/10 de nossa colônia, normais, machos, com 50-60 dias de idade no início dos experimentos.

A infecção dos camundongos se deu por exposição de uma das suas orelhas a um número conhecido de cercárias, segundo técnica de GERKEN et al.<sup>9</sup>, que é ilustrada nas Figuras 1 e 2 e sumariada em seguida. Preliminarmente, foram feitos numa tábua, orifícios com 1,3 cm de diâmetro em cada um dos quais foi afixado por pressão, um "batoque" (artefato de poliestireno com 1,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de profundidade, em geral usado para tampar garrafas; aqui, o "batoque" foi destinado a funcionar como recipiente ou "poço" para conter a suspensão cercariana). Camundongos, previamente anestesiados por aplicação por via intraperitoneal de 120 mg/kg de Diempax (Lafi — Usafarma, São Paulo) e, dez minutos após, com aplicação de 35 mg/kg de Nembutal (Abbott, São Paulo), eram presos na tábua acima descrita de modo que uma de suas orelhas ficasse imersa numa suspensão de 250-350 cercárias aplicadas a cada poço (cercárias aplicadas ou CA). Decorridos de 15 a 60 minutos de contacto com as cercárias, os camundongos eram removidos da tábua e transferidos para gaiolas, onde eram mantidos até o momento de recuperação dos parasitas.

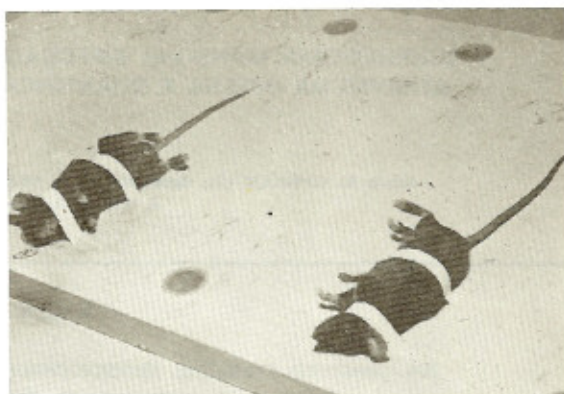


Fig. 1 — Infecção de orelhas de camundongos por cercárias do *S. mansoni*

Orelhas de camundongos presas a uma tábua por meio de fitas de esparadrapo, permaneceram mergulhadas, durante 5 a 50 minutos, em recipiente de poliestireno contendo 250 a 350 cercárias.

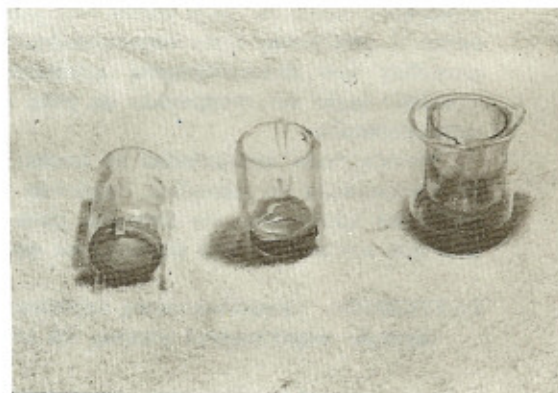


Fig. 2 — Recuperação de esquistossômulos de fragmentos de orelhas de camundongos

Fragmentos de orelhas infectadas de camundongos eram depositados sobre a tela de arame, em contacto com a solução de incubação, contida no béquer. Após quatro horas de incubação a 37°C, procedia-se a obtenção dos esquistossômulos, que migraram dos fragmentos para a solução de incubação.

Realizada a infecção, coletava-se o conteúdo de cada poço, para contagem dos corpos cercarianos e cercárias íntegras que, somados, correspondiam às cercárias que não penetravam (CNP). Procedia-se então ao cálculo das cercárias que penetraram (CP), que, expresso em porcentagem, era feito usando-se a seguinte fórmula:

$$CP (\%) = \frac{CA - CNP}{CA} \times 100$$

## Recuperação dos parasitas

As recuperações dos esquistossômulos das orelhas infectadas foram realizadas nos períodos de pós-infecção indicados em cada experimento, de acordo com a técnica anteriormente descrita<sup>2</sup>, adaptada de técnicas de obtenção de esquistossômulos pulmonares<sup>3</sup>. A orelha infectada do camundongo mantido sob anestesia era removida cirurgicamente e transferida para suporte de máquina apropriada para obtenção de fragmentos com cerca de 300 micrômetros (The Mickie Laboratory Eng. Co., Surrey, Inglaterra). A fim de facilitar a obtenção de fragmentos, cobria-se cada orelha com um pedaço de plástico fino (Zapp — Vulcan, São Paulo). Os fragmentos eram incubados a 37°C, por quatro horas, em salina de Earle tamponada com Hepes (20 mM) em pH 7.4, e ainda contendo: 0,5% de hidrolisado de lactoalbumina, uma unidade/ml de estreptomina e uma unidade/ml de penicilina (solução de incubação). Para a incubação, utilizava-se o dispositivo exposto na Figura 2. Ele consiste de um frasco de vidro, com ambas as extremidades vazadas, estando uma delas recoberta por uma tela de arame (cujos orifícios tinham diâmetro de 200 micrômetros) e presa a suportes de plástico. Este dispositivo era colocado em um béquer de 50 ml contendo cer-

ca de 10 ml da solução de incubação. Os parasitas migravam dos fragmentos de tecidos depositados na tela de arame para a solução de incubação, de onde eram reconhecidos e contados. Para isto, a solução de incubação era transferida para tubo de centrifuga, centrifugada e decantada. Ao sedimento, adicionavam-se duas gotas de solução 0,2% de vermelho neutro, que cora os esquistossômulos<sup>6</sup>. Para contagem, o sedimento era transferido para lâmina de plástico com fundo quadriculado e examinado ao microscópio de inversão (WILD M40, Suíça). Para efeito de comparação, parasitas eram também recuperados dos pulmões — por técnica de SHER et al.<sup>18</sup>, modificada por CORREA-OLIVEIRA et al.<sup>13</sup> — e do sistema porta, por perfusão, usando-se técnica de PELLEGRINO & SIQUEIRA<sup>17</sup>.

## RESULTADOS

Cerca de 80% das cercárias penetram na orelha de camundongos normais, quando postas em contacto com esse órgão por 45 minutos. Destas, 30% são recolhidas do sistema porta como vermes adultos, no 40º dia de infecção (Tabela 1). Isto implica que a orelha de camundongo é um sítio que pode ser utilizado para provocar infecções experimentais viáveis com o *S. mansoni*.

T A B E L A 1

Recuperação de vermes do sistema porta de camundongos normais infectados com o *S. mansoni* através da orelha

Experimentos	Cercárias			Vermes recuperados do sistema oprta (a)	% (b)
	Aplicadas	Que penetraram (%)	Restantes (%)		
1	250	185 (74)	65 (26)	54 ± 19	29
2	270	200 (74)	70 (26)	63 ± 16	32
3	250	210 (84)	40 (16)	46 ± 13	23
4	250	218 (87)	32 (13)	78 ± 19	36
5	260	214 (82)	46 (18)	59 ± 25	28
6	250	195 (78)	55 (22)	70 ± 19	36
7	260	214 (82)	46 (18)	59 ± 25	28

Orelhas de camundongos normais foram expostas a 250-270 cercárias por 50 minutos. No 40.º dia após a infecção procedeu-se à recuperação dos vermes do sistema porta.

(a) média ± d.p.; (n = 7 a 10)

(b) porcentagem de vermes recuperados em relação ao número de organismos que penetraram.

A Tabela 2 mostra que se recuperam esquistossômulos da pele incubando-se fragmentos do tecido em solução salina de Earle enriquecida com hidrolisado de lactoalbumina. Essa recuperação é todavia menor que a recuperação de vermes obtida do sistema porta.

A Figura 3 mostra que as recuperações de esquistossômulos de fragmentos da orelha são mais elevadas nos primeiro e segundo dias (23% e 21%, respectivamente), declinando a partir daí para apenas 1% no 5.º dia. Estudou-se o tempo em que os parasitas permanecem no sí-

TABELA 2  
Número de parasitos recuperados da pele e do sistema porta de camundongos normais

Número de cercárias			Recuperação dos parasitas				
aplica- das (A)	que pene- traram (B)	% (C)	Pele Média ± dp (D)	(%) (E)	Sistema porta Média ± dp (F)	Pele/ sistema porta (%) (G) (H)	
350	314	(90)	98 ± 25	(31)	122 ± 20 (a)	(39)	80
250	195	(78)	56 ± 15	(29)	70 ± 19	(36)	80
250	185	(74)	43 ± 06	(23)	54 ± 19	(29)	80
250	218	(87)	57 ± 17	(26)	78 ± 19	(36)	73
270	200	(74)	40 ± 10	(20)	53 ± 20	(27)	76

Orelhas de camundongos normais foram expostas a 250-350 cercárias (A) por 50 minutos. As diferenças entre as cercárias aplicadas e as restantes nos recipientes representam as que penetraram (B). A coluna C indica a porcentagem de parasitas que penetraram. Recuperação dos parasitas foram efetuadas de orelhas (D) e do sistema porta (F) no segundo e 40.º dia, respectivamente. A coluna H mostra a porcentagem de parasitas obtidos da pele em relação aos obtidos do sistema porta (n = 7 a 9).

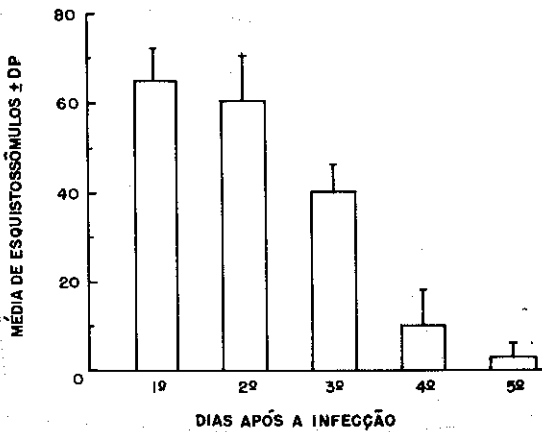


Fig. 3 — Recuperação de esquistossômulos de fragmentos de orelhas de camundongos normais, dias após a infecção. Orelhas de camundongos normais foram expostas a  $280 \pm 18$  cercárias. A recuperação dos esquistossômulos se deu pela incubação em Elac, de fragmentos de orelhas coletadas em dias sucessivos após a infecção.

tio de penetração. Para isto, camundongos foram infectados por uma de suas orelhas, que eram removidas em dias sucessivos após a infecção, até o quarto dia. Decorridos cinco dias da infecção, os camundongos eram sacrificados e obtinham-se esquistossômulos dos pulmões. Como mostra a Figura 4, não foram recuperados parasitas dos pulmões dos animais cujas orelhas foram removidas até dois dias após a infecção; remoção a partir do terceiro dia não impediu a migração dos parasitas para os pulmões, que já ocorreu quase totalmente no quarto dia da infecção. Disto se infere que os parasitas permanecem no local da infecção por pelo menos dois dias, após o que começam sua migração para os pulmões.

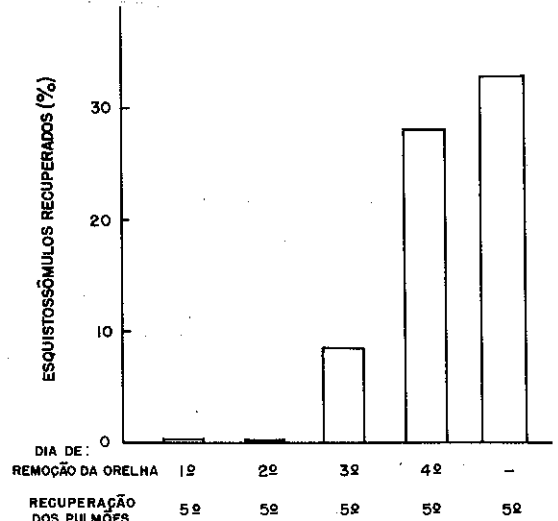


Fig. 4 — Recuperação de esquistossômulos dos pulmões de camundongos infectados através da orelha, removida cirurgicamente em dias sucessivos após a infecção

Orelhas de camundongos normais foram expostas a  $250 \pm 15$  cercárias. Nos dias indicados na Figura, as orelhas foram retiradas dos camundongos previamente anestesiados. Os esquistossômulos foram recuperados de fragmentos de pulmões, incubados em Elac, no 5.º dia após a infecção (n = 7).

Fez-se tentativa de obter esquistossômulos da pele e dos pulmões dos mesmos animais nos dias que se sucedem à infecção. A Figura 5 mostra que no primeiro e segundo dias recuperou-se esquistossômulos somente das orelhas, mas não dos pulmões. A partir do quarto dia, é predominante o número de parasitas recuperados dos pulmões. Os dados contidos na Tabela 3 referem-se a experimento no qual tentou-se padronizar o tempo de exposição a cercárias que favorece infecções mais elevadas.

Como pode ser visto nessa Tabela, infecções mais elevadas são obtidas a partir de 45 minutos de contacto das orelhas com a suspensão cercariana.

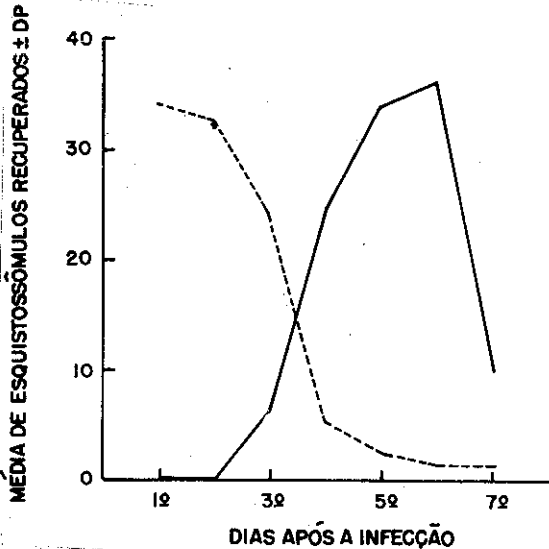


Fig. 5 — Recuperação simultânea de esquistossômulos da pele e dos pulmões de camundongos normais, dias após a infecção. Orelhas de camundongos normais foram expostas a  $258 \pm 18$  cercárias por 50 minutos. Nos dias que se seguiram os esquistossômulos foram recuperados de fragmentos de orelhas (.....) e dos pulmões (.....) incubados em Elac ( $n = 7$ ).

## DISCUSSÃO

No presente trabalho, buscou-se desenvolver um método simples de infectar camundongos através da pele, uma vez que ela é o sítio onde morre a maior parte das cercárias que penetram no organismo<sup>19</sup>. Por outro lado, é também importante desenvolver método de obtenção de esquistossômulos resultantes dessa infecção para que se possa analisar os eventos que ocorrem no período inicial da infecção pelo *S. mansoni* e que conduzem à redução local do parasitismo.

A infecção através da orelha dispensa algumas operações preparatórias do sítio de infecção, destacando-se a depilação que se faz com auxílio de lâminas apropriadas<sup>20</sup>. As operações adicionais podem também afetar componentes da epiderme que se supõem possam estar envolvidos na resistência à penetração das cercárias<sup>7</sup>. De fato, a infecção através da orelha demonstra ser menos eficiente que aquela que se faz através da pele depilada do abdomen; enquanto nesta penetram 90% das cercárias (dados não publicados) através da orelha penetram 80% (Tabelas 1 e 2).

É importante ressaltar que, em várias infecções experimentais, parte das cercárias não

TABELA 3

Esquistossômulos recuperados da pele de camundongos normais submetidos a diferentes tempos de exposição a cercárias

Experimentos	Cercárias			Média de esquistossômulos recuperados ± dp	%
	Aplicadas	Tempo de exposição	Que penetraram (%)		
1	220	15	165 (75)	33 ± 06	20 (a)
		30	189 (86)	36 ± 10	19
		45	187 (85)	43 ± 05	23
		60	175 (80)	49 ± 09	28
2	260	15	182 (70)	42 ± 13	23
		30	152 (60)	41 ± 18	27
		45	158 (61)	41 ± 10	26
		60	186 (72)	52 ± 14	28

(a) porcentagem de esquistossômulos recuperados em relação ao número de cercárias que penetraram. Orelhas de camundongos normais foram expostas por tempos variáveis, a  $220 \pm 18$  e  $260 \pm 29$  cercárias nos experimentos 1 e 2, respectivamente. Dois dias após os esquistossômulos foram recuperados de fragmentos da orelha incubados em Elac ( $n = 7$ ).

é capaz de penetrar na pele dos hospedeiros<sup>12,19</sup>. Em nossos experimentos, 20% das cercárias (10 a 31%) não penetraram nas orelhas dos camundongos, mesmo após contacto por 50 minutos (Tabelas 1 e 2). Perda de in-

fectividade poderia contribuir para esses resultados uma vez que cerca de 3 horas separam o início de eliminação das cercárias pelos caramujos e a infecção das orelhas de camundongos. Desde que as cercárias apresentam,

quando livres, extraordinária atividade e vivem às custas de suas próprias reservas de glicogênio<sup>1</sup> é aceitável que esse período, separando a saída das larvas dos moluscos e seu contacto com o pele do hospedeiro, influencie em sua capacidade de penetração. Por outro lado, a penetração das larvas deve ser dificultada pela barreira constituída pelas camadas superficiais da epiderme. Recentemente, FUKUYAMA & cols.<sup>7</sup> sugeriram que as células epidérmicas funcionariam não somente como um obstáculo mecânico mas, também, como uma barreira química à invasão cercariana, uma vez que purificaram dessas células uma substância que inibe o efeito das proteinases secretadas pelas glândulas pré-acetabulares.

A penetração das cercárias na pele é rápida e parece não se elevar quando hospedeiro e formas infectantes permanecem em contacto por mais que 45 minutos (Tabela 3). Dessa penetração (74-90%) resulta uma infecção na qual o parasita atinge seu estágio final de desenvolvimento e, como tal, é recuperado do sistema porta (22-39%) em níveis comparáveis aos obtidos de animais infectados por outros sítios<sup>12,14,19</sup>. Dessa maneira, a infecção através da orelha parece-nos ser, do ponto de vista parasitológico, método simples e confiável para produção de infecção experimental de camundongos.

Com relação à recuperação do *S. mansoni*, verificamos ser possível obtenção de parasitas (Tabela 2, Figura 3) a partir da incubação de fragmentos de tecidos em um meio salino enriquecido com hidrolisado de lactoalbumina de maneira semelhante à usada para obtenção de esquistossômulos dos pulmões<sup>3</sup> — o que representa modo mais simples que o método de SMITHERS & GAMMAGE<sup>19</sup>.

No segundo dia após a infecção, foram obtidos da pele de camundongos infectados cerca de 26% das formas que penetraram (Figura 3, Tabela 2). Essa proporção é um pouco menor que a obtida do sistema porta (33%) o que seria explicável pela possível segmentação de parasitas durante a obtenção de fragmentos de tecidos, que perderiam assim sua capacidade migratória para a solução de incubação. Ainda assim, é possível verificar-se que apenas proporção variando entre 20 e 30% das larvas que penetraram pode ser recuperada

da pele, logo após a infecção; a maior parte dos parasitas que penetram no hospedeiro não é recuperada nos animais infectados<sup>12,19</sup> nem visualizada no sítio da infecção por observação histológica<sup>11</sup>. Esses resultados têm sido atribuídos à elevada mortalidade que poderia estar ocorrendo na pele, nas primeiras horas após a infecção<sup>10,12,19</sup>, possivelmente devido à exaustão de suas reservas energéticas<sup>2</sup> ou por mecanismos "inespecíficos" de defesa do hospedeiro<sup>9</sup>. Recentemente, porém, MANGOLD & DEAN<sup>19</sup> responsabilizaram um sítio pós-pulmonar pela eliminação dos esquistossômulos nos hospedeiros normais.

Na pele da orelha, uma elevada porcentagem dos parasitas aí permanece por dois dias após a infecção (Figuras 3 e 4). Da pele do abdomen e da cauda os esquistossômulos começam a migrar para os pulmões no segundo dia após a infecção. Aí se acumulam, alcançando quantidade mais elevada nos quinto e sexto dias e redução no número de parasitas nos dias subseqüentes<sup>18</sup>. De maneira semelhante, nossos resultados mostram os esquistossômulos iniciando a migração no segundo dia, chegando aos pulmões no período compreendido entre os segundo e quinto dias e apresentando maior recuperação no sexto dia. A brusca redução que se observa no dia posterior traduz o trânsito de um grande número de esquistossômulos para o sistema porta (Figura 5).

A observação de que os parasitas permanecem no sítio da infecção por dois dias torna o período de zero a dois dias próprio para o estudo de eventos imunoparasitológicos que envolvam a relação parasito-hospedeiro nos momentos iniciais da infecção.

Nossos dados, como também estudos prévios<sup>12,19</sup> revelam que somente parte dos parasitas que penetram na pele de camundongos normais é recuperada como vermes adultos no sistema porta. Os resultados da Tabela 2 nos mostram que do total de parasitas que atinge o sistema porta, elevada proporção (73-80%) é passível de ser recuperada da pele como esquistossômulos. Por essa elevada proporção, é possível explorar-se o índice de recuperação de parasitas de orelhas como parâmetro parasitológico indicativo de efeitos de resistência ocorrendo tanto em animais normais quanto em animais imunes.

Os resultados sugerem que orelhas de camundongos sejam locais adequados ao acesso das cercárias no hospedeiro e à migração dos esquistossômulos. Revelando-se, também, apropriadas a técnicas de recuperação de parasitas, poderão ser utilizadas como modelo experimental para estudos que envolvam imunidade cutânea de camundongos ao *S. mansoni*.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a José de Souza Filho e a Maria Ester Soares de Oliveira pela colaboração técnica. Agradecemos também ao GIDE pelo fornecimento das cercárias usadas neste trabalho.

#### SUMMARY

***Schistosoma mansoni*: experimental infection of mice through the ear and estimation of skin parasitism.**

A method is presented to recover schistosomula from the skin of ear infected mice. About 80% of the cercariae applied to the ear were able to penetrate the mouse skin and 30% of them were recovered from the portal system as adult worms. The best recovery of larvae from the ear occurred in the two days that follow the penetration. From the 3rd day on, parasites were recovered both from skin and lungs and on the 4th day they were already found mainly in the lungs. From 73 to 80% of the parasites eventually found in the portal system can be recovered as schistosomula from the skin on the 2nd day of infection.

The use of the mouse ears is suggested for the parasitological analysis of the initial events of the *S. mansoni* infection both in normal and in immune animals, for they are very convenient to the cercarial access and to the use of methods of study of migration and recuperation of the larvae.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BRUCE, J. I.; WEISS, E.; STIREWALT, M. A. & LINCICOME, D. R. — *Schistosoma mansoni*: glycogen content and utilization of glucose, pyruvate, glutamate and citric acid cycle intermediates by cercariae and schistosomulum. *Exp. Parasit.*, 26: 29-40, 1969.
2. CLEGG, J. A. & SMITHERS, S. R. — Death of schistosome cercariae during penetration of the skin. *II — Penetration of mammalian skin by Schistosoma mansoni. Parasitology*, 58: 111-128, 1968.
3. CORREA-OLIVEIRA, R.; MOTA-SANTOS, T. A. & GAZZINELLI, G. — *Schistosoma mansoni*: "in vitro" and "in vivo" killing of antibody-coated schistosomula. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 31: 991-998, 1982.
4. DEAN, D. A.; CIOLI, D. & BUKOWSKI, M. — Resistance induced by normal and irradiated *Schistosoma mansoni*: ability of various worm stages to serve as inducers and targets in mice. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 30: 1026-1032, 1981.
5. DEAN, D. A.; MINARD, P.; MURRELL, R. D. & VAN-NIER, W. E. — Resistance of mice to secondary infection with *Schistosoma mansoni*. II — Evidence for a correlation between egg deposition and worm elimination. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 27: 957-965, 1978a.
6. DEAN, D. A.; MINARD, P.; STIREWALT, M. A.; VAN-NIER, W. E. & MURRELL, K. D. — Resistance of mice to secondary infection with *Schistosoma mansoni*. I — Comparison of bisexual and unisexual infections. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 27: 951-956, 1978b.
7. FUKUYAMA, K.; TZENG, S.; MCKERROW, J. & EPSTEIN, W. L. — The epidermal barrier to *Schistosoma mansoni* infection. *Curr. Probl. Derm.*, 11: 185-193, 1983.
8. GAZZINELLI, G.; OLIVEIRA, C. G.; FIGUEIREDO, E. A.; PEREIRA, L. H.; COELHO, P. M. Z. & PELLEGRINO, J. — *Schistosoma mansoni*: biochemical evidence for morphogenetic change from cercaria to schistosomule. *Exp. Parasit.*, 34: 181-188, 1973.
9. GERKEN, S. E.; MOTA-SANTOS, T. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; DIAS DA SILVA, W. & GAZZINELLI, G. — The involvement of mast cell and vasoactive amines in the recovery of schistosomula of *Schistosoma mansoni* from mouse skin. *raz. J. med. biol. Res.*, 17: 301-307, 1984.
10. GHANDOUR, A. M. & WEBBE, G. — A study of the death of *Schistosoma mansoni* cercariae during penetration of mammalian host skin the influence of the ages of cercariae and of the host. *Int. J. Parasit.*, 3: 794-784, 1973.
11. INCANI, R. N. & McLAREN, D. J. — Histopathological and ultrastructural studies of cutaneous reactions elicited in naive and chronically infected mice by invading schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasit.*, 14: 259-276, 1984.
12. LAWSON, J. R. & WILSON, R. Q. — The relationship between the age of *Schistosoma mansoni* cercariae and their ability to penetrate and infect mammalian host. *Parasitology*, 87: 481-492, 1983.
13. MANGOLD, B. L. & DEAN, D. A. — Autoradiographic analysis of *Schistosoma mansoni* migration from skin to lungs in naive mice. Evidence that most attrition occurs after the skin phase. *Amer. J. trop. Hyg.*, 32: 785-789, 1983.

14. MOTA-SANTOS, T. A.; TOLEDO, M. I.; CORREA, M. C. R.; CORREA-OLIVEIRA, R. & GAZZINELLI, G. — Schistosomiasis from *S. mansoni* in mice: the relationship between acquired immunity and serum levels of lethal antibody. *Paras. Immunol.*, 3: 319-327, 1981.
15. OLIVIER, L. J. — Infectivity of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 15: 882-885, 1966.
16. OLIVIER, L. & SCHNEIDERMANN, M. — Acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection in laboratory animals. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 2: 289-306, 1953.
17. PELLEGRINO, J. & SIQUEIRA, A. F. — Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Rev. bras. Malar.*, 8: 589-597, 1956.
18. SHER, A.; MACKENZIE, P. & SMITHERS, S. R. — Decreased recovery of invading parasites from the lungs as a parameter of acquired immunity of schistosomiasis in the mouse. *J. infect. Dis.*, 130: 626-633, 1974.
19. SMITHERS, S. R. & GAMMAGE, K. — Recovery of *Schistosoma mansoni* from the skin, lungs and hepatic portal system of naive mice and mice previously exposed to *S. mansoni*: evidence for two phases of parasite attrition in immune mice. *Parasitology*, 80: 289-300, 1980.
20. SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. — Acquired resistance to experimental infection of *Schistosoma mansoni* in the albino rat. *Parasitology*, 55: 711-717, 1965.
21. STIREWALT, M. A. & HACKEY, J. R. — Penetration of host skin by cercariae of *Schistosoma mansoni*: I — Observed entry into skin of mouse, hamster, rat, monkey, and man. *J. Parasit.*, 42: 565-580, 1956.
22. TAVARES, C. A. P.; SOARES, R. C.; COELHO, P. M. Z. & GAZZINELLI, G. — *Schistosoma mansoni*: evidence for a role of serum factors in protecting artificially transformed schistosomula against antibody-mediated killing "in vitro". *Parasitology*, 74: 61-71, 1978a.

Recebido para publicação em 18/11/85.