

ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

II — EVOLUÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNAS SÉRICAS E DO PERFIL ELETROFORÉTICO POR TÉCNICAS DE IMUNOELETROFORESE QUANTITATIVA

Ajax Mercês Atta *
Luiz Augusto Magalhães **
Humberto de Araujo Rangel ***

ATTA, A.M. et al. Esquistossomose mansônica. II — Evolução dos níveis de proteínas séricas e do perfil eletroforético por técnicas de imunoelectroforese quantitativa. *Rev. Saúde públ., S. Paulo, 15:194-204, 1981.*

RESUMO: Camundongos *Swiss* foram infectados com 100 cercárias da linhagem mineira (BH) do *Schistosoma mansoni* e sacrificados semanalmente no período de 8 semanas de infecção. Os níveis de proteínas séricas totais destes animais não diferiram dos apresentados pelos animais controles. Os níveis de albumina sérica determinados por "Rocket immunoelectrophoresis" acharam-se diminuídos nas 5^a, 6^a e 7^a semanas de infecção. O perfil obtido por imunoelectroforese cruzada revelou alterações em componentes séricos com mobilidade nas regiões de gama, beta e em menor grau de alfa-globulinas, após a oviposição do parasito.

UNITERMOS: *Schistosoma mansoni*. Camundongos. Proteínas do sangue, electroforese.

INTRODUÇÃO

Diversos autores estudaram as alterações dos níveis de proteínas séricas e seu perfil eletroforético tanto na esquistossomose mansônica humana como experimentalmente em roedores de laboratório.

Fiorillo⁵ (1954) foi o primeiro a utilizar a técnica de electroforese no estudo da patogenia do *S. mansoni* em pacientes esquistossomóticos. Evans e Stirewalt⁴ (1957), utilizando camundongos infectados experimentalmente por *S. mansoni*, concluíram que

existiam modificações no perfil eletroforético obtido pela técnica de electroforese em papel, nas regiões de gama e beta-globulinas além de decréscimo relativo em albumina.

De Witt e Warren³ (1959) observaram que os perfis eletroforéticos dos soros de camundongos infectados experimentalmente por *S. mansoni* apresentavam as regiões de gama e beta-globulinas aumentadas, enquanto que pouca ou quase nenhuma modi-

* Da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (Pós-graduando), e do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas — Cidade Universitária Barão Geraldo — Caixa Postal 1409 — 13100 — Campinas, SP — Brasil.

** Do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP — Cidade Universitária Barão Geraldo — Caixa Postal 1409 — 13100 — Campinas, SP — Brasil.

*** Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP — Cidade Universitária Barão Geraldo — Caixa Postal 6109 — 13100 — Campinas, SP — Brasil.

ficação foi verificada na região de alfa-globulinas e albumina, devendo-se a inversão da relação A/G ao aumento descompensado das globulinas.

Kagan e Goodchild⁹ (1961) confirmaram os achados destes autores acrescentando a observação de que em camundongos o aumento das proteínas com mobilidade nas regiões de gama e beta-globulinas estava correlacionado com o aparecimento de anticorpos contra cercárias do *S. mansoni*.

Sadun e Williams¹⁶ (1966) observaram que o aumento das proteínas séricas totais se dava em camundongos esquistossomóticos a partir da 8ª semana de infecção, assim como existiam modificações nas regiões de gama, beta e alfa₂-globulinas. Segundo estes autores a inversão da relação A/G tornava-se mais pronunciada com a evolução da doença, particularmente nos soros dos animais portadores de carga parasitária alta.

Hillyer e Frick⁷ (1967) através de imunoeletroforese observaram que os soros de camundongos com esquistossomose mansônica apresentavam aumento em IgG₁, IgA, IgM e IgG₂, sendo que esta última já se encontrava elevada na 6ª semana de infecção. Fizeram estes autores alusão ao aumento de uma alfa₁-globulina rápida na 8ª semana de infecção.

Utilizando eletroforese em acetato de celulose, Page e col.¹⁵ (1972) verificaram que as alterações nos níveis de proteínas séricas, na fase pré-postural de infecções intensas por *S. mansoni* em camundongos, faziam-se às custas do aumento em alfa₁, alfa₂, beta e gama-globulinas, existindo também nos soros destes animais inversão da relação A/G.

A utilização de técnicas de imunoeletroforese quantitativa nas análises das proteínas séricas (Weeke^{20,21}, 1973) tem possibilitado informações mais precisas dos níveis destas macromoléculas em diversos estados patológicos. Por outro lado, flutuações nos níveis séricos de imunoglobulinas

de camundongos, na ausência de infecção e associadas com a idade dos animais, foram verificadas por Kalpaktsoglou e col.¹⁰ (1973).

Levando em consideração estas observações, o presente trabalho tem por objetivo verificar as possíveis alterações nos níveis das proteínas séricas de camundongos infectados experimentalmente por *S. mansoni* nos períodos pré e pós-postural da infecção, utilizando lotes de animais da mesma idade e técnicas de imunoeletroforese quantitativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Animal experimental. Cento e sessenta camundongos *Swiss* de 30 dias de idade foram utilizados no presente trabalho. Formaram-se 8 lotes de animais infectados constituídos de 5 machos e 5 fêmeas, lotes estes designados pela sigla *In*, correspondendo *n* à semana da infecção em que foi realizado o sacrifício.

Paralelamente foram utilizados como grupo controle, 8 lotes constituídos, cada um, de 10 animais não infectados (5 machos e 5 fêmeas). Estes grupos foram identificados pela sigla *Cn*. Como para os animais infectados, *n* correspondeu à semana do sacrifício.

Cercárias de Schistosoma mansoni. Na infecção experimental dos camundongos foram utilizadas cercárias da linhagem mineira (BH) de *S. mansoni* procedentes de *Biomphalaria glabrata*.

Infecção experimental. Na infecção experimental dos animais foi utilizada a técnica de imersão da cauda em suspensão cercariana de *S. mansoni*, usando-se 100 cercárias por animal. O número de cercárias que penetraram foi calculado através do método preconizado por Magalhães¹² (1969).

Obtenção e contagem de vermes. A carga parasitária dos animais infectados por *S. mansoni* foi determinada pela contagem dos vermes obtidos através da perfusão do

sistema porta de acordo com Yolles²² (1947) seguida pelo esmagamento do fígado entre lâminas de vidro, segundo técnica de Standen¹⁹ (1953) e Hill⁶ (1956). Os vermes obtidos foram separados e contados de acordo com o sexo, sendo aplicada a denominação de esquistossomulos para os vermes obtidos nas semanas iniciais de infecção e nas quais não foi possível a identificação do sexo em virtude do pouco desenvolvimento do aparelho reprodutor.

Soro de camundongo. Animais previamente anestesiados sofreram sangria branca pelo plexo vascular braquial. O sangue assim colhido foi deixado coagular à temperatura ambiente e os soros obtidos foram reunidos em "pools" por lotes. Estes "pools" foram centrifugados durante 15 minutos a $270 \times g$ a 0°C, sendo posteriormente congelados a -20°C até a hora de sua utilização.

Dosagem de proteínas séricas. As proteínas séricas dos soros representativos das diversas semanas de infecção, oriundos dos animais controles e infectados, foram determinadas pela reação com o biureto, segundo a técnica de Weichselbaun modificada por Dittembrandt (Oliveira Lima e Dias da Silva¹⁴, 1970). Para a realização das dosagens de proteínas utilizou-se uma curva padrão traçada a partir de uma solução de soroalbumina bovina previamente dosada pelo processo de micro Kjeldahl segundo Kabat e Mayer⁸ (1968).

Soro imune de coelho anti-proteínas séricas de camundongo. Com a finalidade de obtenção de anti-soro anti-proteínas séricas de camundongo, um coelho albino de cerca de 3 Kgs de peso corporal foi imunizado por meio de injeções intramusculares de 10 mg de proteínas obtidas de soro de camundongo, emulsionadas em igual volume de adjuvante completo de Freund. Decorridos 30 dias, este animal foi imunizado novamente, por via subcutânea, com o antígeno nas mesmas condições da primeira imunização. Vinte e um dias após a segunda dose imunizante, o soro obtido deste animal apresentou, utilizando-se a técnica de Ouch-

terlony (Oliveira Lima e Dias da Silva¹⁴, 1970), título de 1:32 frente a 500 microgramas do antígeno por ml. Nesta ocasião o coelho imunizado sofreu sangria branca.

Determinação dos níveis de albumina sérica. Os níveis de albumina sérica nos camundongos infectados por *S. mansoni* e nos camundongos controles foram determinados em triplicata através da técnica de "Rocket immunoelectrophoresis" segundo Weeke²¹ (1973). Volumes de um microlitro de uma diluição a 1:16 em tampão barbital-glicina/tris (pH 8.6, força iônica 0.02) de "pools" de soros de animais controles e infectados foram submetidos à eletroforese em agarose a 1% no referido tampão, contendo soro imune de coelho anti-proteínas séricas de camundongo na diluição de 1:35.

A eletroforese foi realizada usando-se uma diferença de potencial de 6 volts/cm durante 3 h. Após revelação da placa onde se processou a eletroforese, os picos correspondentes à albumina tiveram suas alturas determinadas em milímetros. Como revelador foi utilizado Coomassie Blue a 0,1% em etanol-ácido acético.

Imunoeletroforese cruzada. Os soros dos camundongos infectados e dos animais dos grupos controle foram analisados quanto ao perfil eletroforético, através da técnica de imunoeletroforese cruzada segundo Week²⁰ (1973).

Em todos os procedimentos foram utilizados volumes de um microlitro de soro de camundongo e o soro imune de coelho anti-proteínas séricas de camundongo na diluição de 1:35 em agarose a 1% em tampão barbital-glicina/tris (pH 8.6, força iônica 0.02). A utilização dos soros dos animais infectados e controles de uma mesma semana pós-infecção, em uma única placa, visou eliminar as possíveis variações decorrentes do procedimento técnico usado para a reação de imunoprecipitação.

As eletroforeses realizaram-se em primeira dimensão sob uma diferença de potencial de 8 volts/cm por 1 h enquanto que, em segunda dimensão, a diferença de po-

tencial utilizada foi de 6 volts/cm durante 3 h. Como revelador foi utilizado Coomassie Blue na concentração de 0,1% em etanol-ácido acético.

Análise estatística. Para a avaliação das determinações dos níveis de proteínas séricas totais e dos níveis de albumina dos diversos grupos de animais foi utilizado o teste U de Mann e Whitney¹³ (1947).

RESULTADOS

Determinação da carga parasitária. O número de cercárias penetradas, assim como as médias dos vermes recuperados por perfusão nas diversas semanas pós-infecção, são apresentados na (Tabela 1).

Através da referida Tabela observa-se que as médias das cercárias que penetraram

T A B E L A 1

Média numérica de cercárias penetradas, esquistossômulos e esquistossomos por lote de animais.

Semanas Pós-infecção	Média numérica de cercárias penetradas	Média numérica de esquistossômulos	Média numérica de esquistossomos fêmeos	Média numérica de esquistossomos machos	Média numérica de <i>S. mansoni</i> por animal
1ª	92,60	--	—	—	—
2ª	87,40	—	—	—	—
3ª	91,20	1,20	—	—	1,20
4ª	90,60	0,60	4,00	5,60	10,20
5ª	96,40	—	6,88	12,75	19,63
6ª	92,40	—	19,00	19,60	38,60
7ª	89,50	—	12,20	16,00	28,20
8ª	90,50	—	9,22	16,67	25,89

não diferiram significativamente quando comparados os lotes dos animais sacrificados nas diferentes semanas. A carga parasitária representada pelo número de vermes totais recuperados apresentou valores médios variáveis, tendo sido observado que só a partir da 4ª semana de infecção foi possível a identificação do sexo, apesar da presença concomitante em alguns casos, de esquistossômulos e esquistossomos, revelando um assincronismo na maturação do *S. mansoni*.

Determinação dos níveis de proteínas séricas totais. Os níveis de proteínas séricas totais nas semanas pós-infecção não diferiram significativamente quando comparados os resultados das dosagens efetuadas

semanalmente com "pools" de soros dos animais infectados e controles (Tabela 2).

A relação entre os níveis de proteínas séricas totais dos animais infectados e controles (I/C), nas oito semanas que se seguiram à infecção, apresentou valores compreendidos entre 0,9 e 1,15 (Tabela 2), sugerindo que o aumento na concentração de alguns componentes séricos foi compensado fisiologicamente, não se refletindo na concentração proteica sérica total.

Determinação dos níveis de albumina sérica. Os níveis de albumina sérica, determinados por "Rocket immunoelectrophoresis" em "pools" semanais de soros dos camundongos controles e infectados não diferiram significativamente quando analisadas as oito semanas.

T A B E L A 2

Valores referentes a dosagem de proteínas séricas totais (mg/ml) por lotes de animais.

Semanas Pós-infecção	Em animais infectados	Em animais controles	Relação I/C
1ª	55	48	1.15
2ª	60	58	1.03
3ª	56	60	0.93
4ª	58	53	1.09
5ª	61	55	1.11
6ª	62	60	1.03
7ª	50	52	0.96
8ª	73	66	1.11

Estudando a relação entre o nível de albumina sérica dos animais infectados e o apresentado pelos animais controles, em cada semana isoladamente, verificou-se que houve diminuição na concentração desta proteína nos soros dos animais infectados nas 5ª, 6ª e 7ª semanas (Tabela 3). Houve retorno aos níveis normais na 8ª semana de infecção. Aparentemente a hipoalbuminemia observada nestas semanas de infecção está associada com a oviposição do parasito, sendo porém corrigida fisiologica-

mente pelo hospedeiro à medida que a infecção evolui.

Análise do perfil eletroforético. Os perfis eletroforéticos dos soros dos camundongos infectados, determinados por imunoeletroforese cruzada, quando comparados aos dos animais controles apresentaram alterações na concentração de alguns componentes séricos em função do tempo de infecção.

As alterações mais evidentes correram por conta de quatro componentes, sendo que dois destes possuíam mobilidade ele-

T A B E L A 3

Níveis de albumina sérica determinados por "Rocket immunoelectrophoresis" (altura em mm) por lotes de animais.

Semanas Pós-infecção	Em animais infectados	Em animais controles	Relação I/C
1ª	18	19	0.95
2ª	21	20	1.05
3ª	19	20	0.95
4ª	22	20	1.10
5ª	16	21	0.76
6ª	17	24	0.71
7ª	15	21	0.71
8ª	20	22	0.91

troforética na região de gama-globulinas enquanto que os outros dois migravam na região de beta-globulinas. Com a finalidade de facilitar a observação dessas alterações, estes componentes foram arbitrariamente designados com os números 1, 2, 3 e 4, em ordem crescente de migração no sentido anódico do campo elétrico em que se realizou a corrida eletroforética em primeira dimensão.

Na fase pré-postural da infecção por *S. mansoni* os componentes 1 e 2 apresentaram-se nas mesmas condições que os seus correspondentes nos soros controles nas 1ª, 2ª e 3ª semanas, notando-se porém uma diminuição destas proteínas na 4ª semana de infecção (Figs. 1a,b,c,d). Os componentes 3 e 4, estiveram aumentados nas 1ª e 2ª semanas, retornando aos níveis normais após este período, com exceção do componente 4 que registrou um novo aumento na 4ª semana de infecção (Figs. 1a,b,c,d).

Além do aparente desdobramento do componente 4, observado tanto nos soros infectados como nos controles, a 5ª semana registrou uma diminuição no componente 1 da região de gama-globulinas e de forma menos evidente, modificações em alguns componentes da região de alfa-globulinas (Fig. 2a).

Concomitante com o aparecimento de granulomas hepáticos, foi verificado um aumento progressivo dos componentes 1 e 2 da região de gama e dos componentes 3 e 4 da região de beta-globulinas (Figs. 2b, c, d). Com relação à região de alfa-globulinas alguns componentes estiveram aparentemente aumentados nas 6ª e 7ª semanas de infecção (Figs. 2b,c).

Analisando isoladamente os perfis apresentados pelos soros controles nas diferentes semanas, foi verificado que os componentes 1, 2, 3 e 4 apresentaram flutuações nos seus níveis no período de observação utilizado.

Provavelmente os componentes designados arbitrariamente com os números 1, 2, 3 e 4

correspondem à imunoglobulinas não apenas tendo-se em vista a mobilidade eletroforética como também as modificações apresentadas durante a infecção. Considerando tal hipótese, existiriam dois estímulos antigênicos ao nível humoral durante a infecção; o primeiro surgiria imediatamente após a infecção do hospedeiro pelo *S. mansoni* e determinaria um aumento nas imunoglobulinas com mobilidade na região de beta-globulinas; enquanto que o segundo estímulo, aparentemente mais efetivo, seria determinado pela presença dos ovos do parasito e provocaria um aumento além das imunoglobulinas com mobilidade na região beta, de duas outras com mobilidade na região de gama-globulinas.

DISCUSSÃO

As alterações observadas em alguns componentes séricos e o decréscimo do nível de albumina nas 5ª, 6ª e 7ª semanas de infecção parecem ter sido compensados fisiologicamente, pois a concentração das proteínas séricas totais nos camundongos infectados não apresentaram variações significativas. Aparentemente esta verificação foi em decorrência da pequena carga parasitária apresentada pelos camundongos, pois tem sido observado que o aumento na concentração das proteínas séricas totais se dá mais rapidamente nas infecções intensas (Sadun e Williams¹⁶, 1966; Page e col.¹⁵, 1972).

A queda transitória verificada no nível de albumina sérica dos camundongos infectados não está de acordo com o observado por Evans e Stirewalt⁴ (1957) e De Witt e Warren³ (1958). Kagan e Goodchild⁹ (1961) e Sadun e Williams¹⁶ (1966) verificaram que o decréscimo na concentração da albumina sérica de camundongos com esquistossomose mansônica ocorria simultaneamente ao aumento das globulinas, tornando-se mais pronunciado com a evolução da infecção.

ATTA, A.M. et al. Esquistossomose mansônica. II — Evolução dos níveis de proteínas séricas e do perfil eletroforético por técnicas de imunoeletroforese quantitativa. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 15:194-204, 1981.

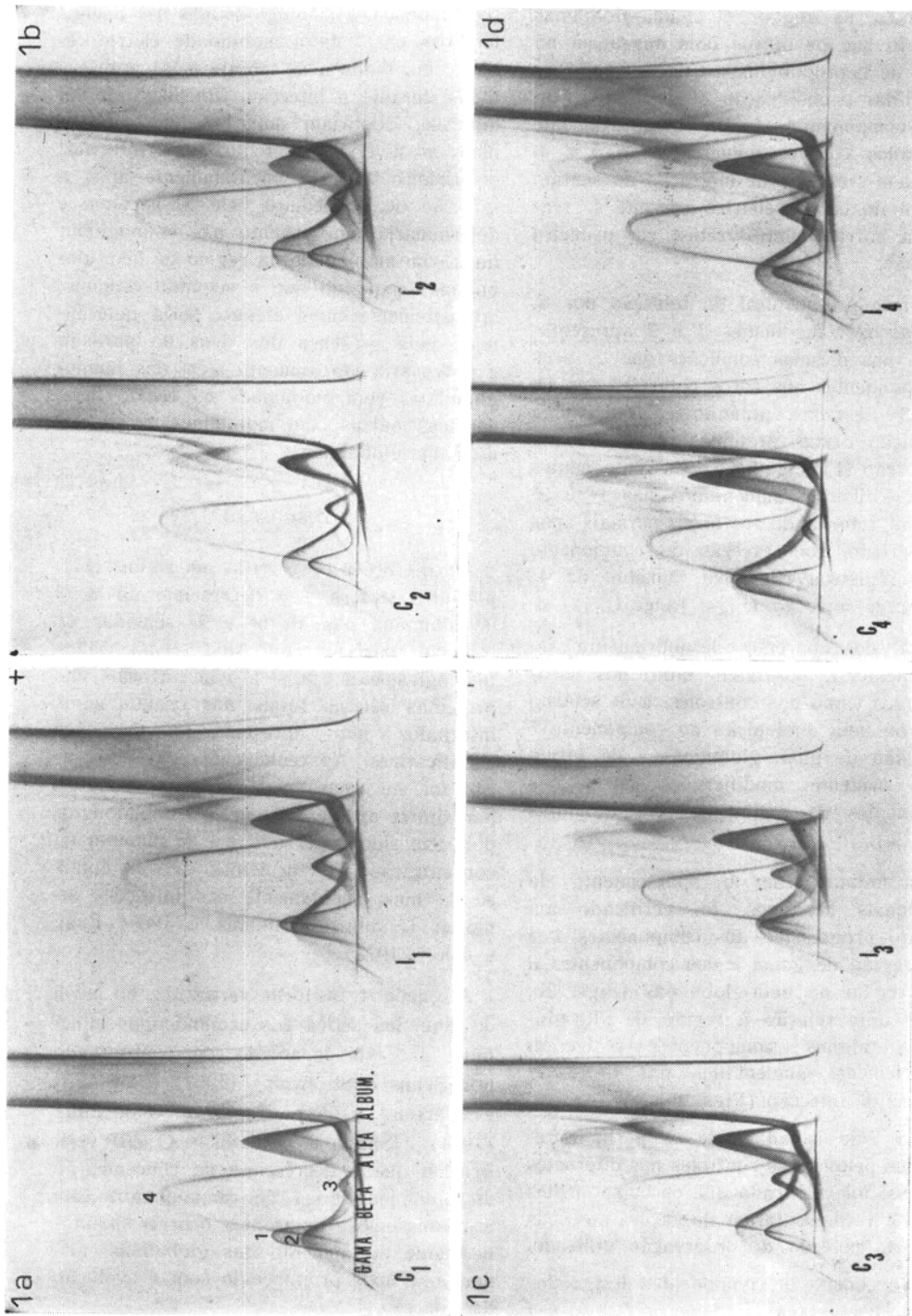


Fig. 1: Evolução do perfil eletroforético dos soros controle e infectado na fase pré-postural da infecção de camundongos por *S. mansoni* (1a, 1b, 1c e 1d correspondem às 1ª, 2ª, 3ª e 4ª semanas respectivamente).

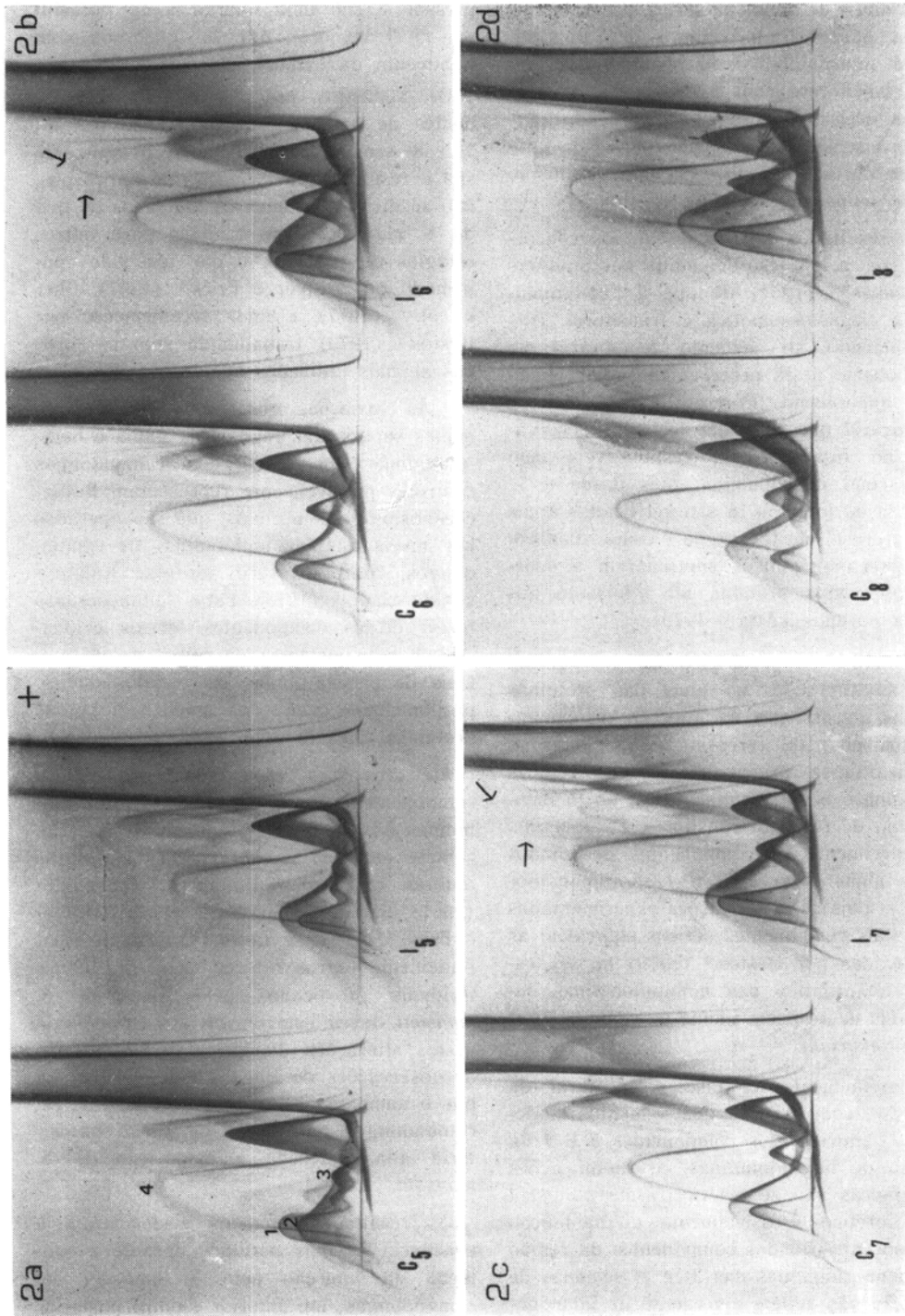


Fig. 1: Evolução do perfil eletroforético dos soros controle e infectado na fase pré-postural da infecção de camandongas por *S. mansoni* (1a, 1b, 1c e 1d correspondem às 1^a, 2^a, 3^a e 4^a semanas respectivamente).

Os níveis de albumina sérica nos trabalhos acima citados foram obtidos de forma indireta, relacionando-se os resultados obtidos por eletroforese com as dosagens de proteínas séricas totais, não oferecendo portanto a sensibilidade apresentada pela imunoelektroforese quantitativa cujo princípio reside numa reação antígeno-anticorpo.

Os resultados aqui apresentados concordam com a hipótese defendida por Smithers e Walker¹⁵ (1961) de que a hipoalbuminemia esquistossomótica é transitória, correspondendo ao aumento temporário no catabolismo desta proteína não compensado pelo anabolismo. Por outro lado, parece improvável que as lesões teciduais observadas no fígado sejam responsáveis pelo decréscimo de albumina, pois desde a 1ª semana de infecção já são verificadas áreas de necrose neste órgão, como também granulomas hepáticos continuaram a ocorrer após esta proteína ter retornado aos níveis normais (Atta¹, 1979).

A análise do perfil eletroforético revelou que as alterações ao nível das proteínas séricas, decorrentes da infecção de camundongos por 100 cercárias de *S. mansoni*, localizaram-se principalmente nas regiões de gama e beta-globulinas além do já mencionado decréscimo transitório da albumina. Provavelmente os componentes designados pelos números 1, 2, 3 e 4 são imunoglobulinas pois as modificações experimentadas por estes componentes séricos equivalem às observadas por Bastos² (1979) no seu estudo quantitativo das imunoglobulinas envolvidas na resposta imune de camundongos ao *S. mansoni*.

Aparentemente na fase pré-postural da infecção, com exceção dos aumentos moderados e iniciais dos componentes 3 e 4 da região de beta-globulinas, as modificações patológicas não se exteriorizaram no perfil eletroforético. Possivelmente a diminuição na concentração dos componentes da região de gama-globulinas nas 3ª e 4ª semanas de infecção não reflete um estado de imunode-

pressão e sim uma tolerância ao parasito em nível humoral, que foi quebrada com o advento da oviposição.

Os aumentos progressivos nos componentes de gama e beta-globulinas nas 6ª, 7ª e 8ª semanas de infecção, provavelmente são o resultado da formação de anticorpos, não só dirigidos contra os antígenos do ovo do *S. mansoni* como também para outros estágios do parasito, o que tem sido confirmado por Hillyer e Frick⁷ (1967), Sher e col.¹⁷ (1977) e mais recentemente por Bastos² (1979) trabalhando com os soros dos animais utilizados no presente trabalho.

As variações observadas nos componentes séricos das regiões de gama e beta-globulinas dos soros dos camundongos controles possivelmente representam flutuações fisiológicas normais, que são operadas nos níveis das imunoglobulinas de camundongos, conforme verificado por Kalpaktoglou e col.¹⁰ (1973). Estas flutuações nos níveis destes componentes séricos evidenciaram a importância da utilização de animais de mesma idade, em estudos que se proponham a avaliar os níveis séricos das proteínas durante uma infecção.

As alterações observadas em alguns componentes séricos da região de alfa-globulinas nas 5ª, 6ª e 7ª semanas de infecção coincidiram com as observações de outros autores tais como Kagan e Goodchild⁹ (1961), Sadun e Williams¹⁶ (1966), Hillyer e Frick⁷ (1967) e Lewert¹¹ (1970). Aparentemente outros fatores, além dos danos teciduais provocados pelos ovos de *S. mansoni*, devem estar envolvidos na etiologia destas alterações. Fortalece esta suposição as observações de Page e col.¹⁵ (1972) de que o aumento destas proteínas séricas, em camundongos portadores de carga parasitária alta, antecede a oviposição do *S. mansoni*.

Os resultados expostos evidenciaram a existência de dois períodos durante a evolução da infecção pelo *S. mansoni* em camundongos; um anterior e outro posterior

à oviposição. Aparentemente os estágios evolutivos do parasito atuam de forma diferente sobre o sistema imune do hospedeiro, resultando desta atuação o estado de tolerância humoral observado na fase pré-postural da infecção e a hiperreatividade da fase pós-postural.

CONCLUSÕES

1. Os níveis de proteínas séricas totais de camundongos *Swiss* infectados por 100 cercárias da linhagem mineira de *Schistosoma mansoni* não diferiram significativamente quando comparados

aos apresentados pelos animais controles no período de oito semanas de infecção.

2. Os níveis de albumina sérica dos camundongos infectados, determinados por imunoelektroforese quantitativa, acharam-se diminuídos nas 5^a, 6^a e 7^a semanas de infecção pelo *S. mansoni*.
3. A oviposição do *S. mansoni* provoca profundas alterações no perfil eletroforético dos soros dos camundongos infectados, observadas através dos aumentos progressivos de componentes com mobilidade eletroforética nas regiões de gama e beta-globulinas.

ATTA, A.M. et al. [Schistosomiasis mansoni. II — Evolution of the levels of serum proteins and of their electrophoretic pattern as traced by quantitative immunoelectrophoresis]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 15:194-204, 1981.

ABSTRACT: *Swiss* mice were infected with 100 cercariae of the Belo Horizonte strain of *Schistosoma mansoni* and were sacrificed weekly during eight weeks following of infection. The levels of serum protein totals in these animals did not differ from those presented by the control animals. However, serum albumin levels that were determined by rocket immunoelectrophoresis were lower during the 5th, 6th, and 7th weeks of infection. The pattern determined by crossed immunoelectrophoresis revealed alterations in serum components with mobility in the gamma and beta regions and, to a lesser degree, alpha-globulins, after oviposition by the parasite.

UNITERMS: *Schistosoma mansoni*. Mice. Blood protein electrophoresis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATTA, A. M. *Estudo sobre a evolução da infecção de camundongos por Schistosoma mansoni Sambon, 1907*. São Paulo, 1979. [Dissertação de Mestrado — Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas].
2. BASTOS, O. C. *Utilização de soros pluri-específicos no estudo da evolução das imunoglobulinas envolvidas na resposta imune de camundongos ao Schistosoma mansoni Sambon, 1907*. São Paulo, 1979. [Tese de Doutorado — Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas].
3. DE WITT, W. B. & WARREN, K. S. Hepatosplenic schistosomiasis in mice. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 8:440-6, 1959.
4. EVANS, A. S. & STIREWALT, M. A. Serologic reactions in *Schistosoma mansoni* infections. III. Ionographic fractionation of sera of mice with progressive disease. *Exp. Parasit.*, 6:8-17, 1957.
5. FIORILLO, A. M. Estudo eletroforético do soro de pacientes portadores de esquistossomose mansoni hepato-esplênica. *Hospital*, Rio de Janeiro, 45:647-51, 1954.

6. HILL, J. Chemotherapeutic studies with laboratory infections of *Schistosoma mansoni*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 50:39-48, 1956.
 7. HILLYER, G. V. & FRICK, L. P. Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* infections. I. Mouse infections. *Exp. Parasit.*, 20:321-5, 1967.
 8. KABAT, E. A. & MAYER, M. M. *Imunoquímica experimental*. México, La Prensa Medica Mexicana, 1968.
 9. KAGAN, J. G. & GOODCHILD, C. G. Paper electrophoresis of sera from man and experimental animals infected with various helminths. *J. Parasit.*, 47:373-7, 1961.
 10. KALPAKTSOGLU, P. K. et al. The five classes of immunoglobulins in normal C3H and BALB/c mice. *J. Immunol.*, 24:303-14, 1973.
 11. LEWERT, A. M. Schistosomes. In: Jackson, G. J. et al., eds. *Immunity to parasitic animals*. New York, Appleton-Century Crofts, 1970. p. 981-1008.
 12. MAGALHÃES, L. A. Técnica para a avaliação da viabilidade de penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. *Hospital*, Rio de Janeiro, 75:137-40, 1969.
 13. MANN, H. B. & WHITNEY, D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. math. Statist.*, 18:52-4, 1947.
 14. OLIVEIRA LIMA, A. & DIAS DA SILVA, W. *Imunologia, imunopatologia e alergia*. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan, 1970.
 15. PAGE, C. R. et al. Experimental prepatent schistosomiasis mansoni: quantitative analyses of proteins, enzyme activity and free amino acids in mouse serum. *Exp. Parasit.*, 31:341-9, 1972.
 16. SADUN, E. H. & WILLIAMS, J. S. Biochemical aspects of Schistosomiasis mansoni in mice in relation to worm burdens and duration of infection. *Exp. Parasit.*, 18:266-73, 1966.
 17. SHER, A. et al. *Schistosoma mansoni*: kinetics and class specificity of hypergammaglobulinemia induced during murine infection. *Exp. Parasit.*, 41:415-22, 1977.
 18. SMITHERS, S. R. & WALKER, P. J. Serum protein changes in monkeys infected with *Schistosoma mansoni*, with special reference to the metabolism of albumin. *Exp. Parasit.*, 11:39-49, 1961.
 19. STANDEN, O. D. Experimental schistosomiasis. III. Chemotherapy and mode of drug action. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 47:26-43, 1953.
 20. WEEKE, B. Crossed immunoelectrophoresis. In: Axelsen, N. H. et al., eds. *A manual of quantitative immunoelectrophoresis*. Oslo, Universitetsforlaget, 1973. p. 47-56.
 21. WEEKE, B. Rocket immunoelectrophoresis. In: Axelsen, N. H. et al., eds. *A manual of quantitative immunoelectrophoresis*. Oslo, Universitetsforlaget, 1973. p. 37-46.
 22. YOLLES, T. K. et al. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. *J. Parasit.*, 33:419-26, 1947.
- Recebido para publicação em 07/10/1980
Aprovado para publicação em 08/12/1980