

Vacunas Anti-Esquistosoma.

Oscar Noya, Sandra Losada, Henry Bermúdez, Maria Angelita Lorenzo, Marilyn Toledo, Belkisyolé Alarcón de Noya.

RESUMEN

El control de la esquistosomiasis se ha basado en la utilización de molusquicidas químicos y biológicos, en la aplicación de medidas de ingeniería sanitaria y en la quimioterapia. Sin embargo, en vista de que es difícil su control y mucho más su erradicación, es necesario desarrollar y aplicar medidas de control alternativas, como son las vacunas. De las seis especies del género *Schistosoma* que afectan al hombre, solo *Schistosoma mansoni* está presente en América. Este hemoparásito dispone de un complejo sistema de mecanismos de evasión contra la respuesta inmune del hospedador y una gran capacidad adaptativa. Los vermes adultos son prácticamente invulnerables a los mecanismos protectores y la única evidencia de protección está asociada a la disminución de su fecundidad. Una de las estrategias particulares contra estos parásitos, son las vacunas anti-fecundidad, que persiguen, más que eliminar a los vermes adultos, limitar la oviposición y en consecuencia, la patología inducida por los huevos. Las cercarias atenuadas por irradiación o fármacos han arrojado un 91% de protección, pero se hace imposible su aplicación masiva. Varias moléculas con conocida actividad biológica han sido identificadas como blancos de la inmunidad protectora anti-esquistosoma. Su potencial como vacunas ha sido evaluado en diferentes modelos animales y sólo la GST-28 ha llegado a experimentarse en humanos pero no supera el 50% de eficacia, denotando la necesidad de buscar nuevos blancos inmunológicos. En este estudio, se utilizó el modelo ratón y como inmunógenos, péptidos sintéticos polimerizables derivados de áreas circundantes al sitio activo de las moléculas escogidas, de manera que los anticuerpos inducidos pudieran impedir la hidrólisis del sustrato respectivo, al ocupar el sitio de acceso por competencia estérica. Péptidos de GST-28, triosa-fosfo-isomerasa (TPI-28), asparaginil endopeptidasa (Sm32), elastasa, catepsina B (Sm31), catepsina D y catepsina L, fueron evaluados individualmente o en mezclas. Hemos obtenido niveles de protección superiores al 50%, con mezclas de péptidos derivados de la GST-28 y de la TPI-28, y particularmente de la Sm32. Son pocos los estudios que han mostrado, en animales de laboratorio, niveles de eficacia comparables a los obtenidos en este trabajo, sobre todo usando péptidos sintéticos.

Palabras clave: esquistosomiasis, vacunas, péptidos sintéticos.

Secciones de Biohelmintiasis e Inmunología del Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Correspondencia: Oscar Noya. E-mail: noyao@ yahoo.com

Financiamiento: FONACIT Proyecto S1-2000000564.

ABSTRACT

Anti-Schistosomiasis vaccines.

Currently, the control of schistosomiasis is based on the use of chemical and biological molluscicides, on the sanitary engineering measures and on chemotherapy. Nevertheless, since the control and eradication is difficult, the development and application of vaccines arise as an alternative control measure. Among the six species of *Schistosoma* affecting man, only *Schistosoma mansoni* is present in America. This haemoparasite has a complex system of evasion mechanisms against the host's immune response and a great adaptive capacity. Adult worms are almost invulnerable to the protection mechanisms and the unique evidence of protection is associated to the reduction of fecundity. One of the strategies against this parasites, are the anti-fecundity vaccines, which instead of killing adult worms, look for limiting oviposition and in consequence, egg-induced pathology. The use of chemical-and/or radiation-attenuated cercariae resulted in 91% of protection, but its massive use is inapplicable. Some molecules with known biological activity have been identified as targets of anti-schistosome protective immunity. Their potential as vaccines has been evaluated in different animal models and only the GST-28 was used in humans and showed an efficacy of 50%, confirming the need of looking for new immunological targets. In this study, polymerizable synthetic peptides derived from areas close to the active site of the target molecules were used for the immunization of outbred mice, so the induced antibodies might prevent the substrate hydrolysis by active site occupation. Peptides derived from glutation S transferase (GST-28), triose phosphate isomerase (TPI-28), asparaginil endopeptidase (Sm32), elastase, cathepsin B (Sm31), cathepsin D and cathepsin L were evaluated individually or in mixtures. We obtained more than 50% of protection with mixtures of GST-28 and TPI-28 derived peptides and particularly from Sm32 peptides. Few are the studies that have shown, in laboratory animals, efficacy levels compared to those obtained in this work, specially using synthetic peptides.

Key words: schistosomiasis, vaccines, synthetic peptides.

INTRODUCCIÓN

Importancia de la esquistosomiasis.

Entre las parasitosis de importancia médica, la esquistosomiasis mantiene el segundo lugar en importancia, después de la malaria. Esa ubicación es producto de su alta prevalencia, estimándose en más de 200 millones las personas infectadas distribuidas en América, África y Asia (1,2). Seis especies de parásitos del género *Schistosoma* afectan al humano: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. guineensis*, *S. japonicum* y *S. mekongi*. La primera de ellas es la especie más extendida, ya que se encuentra distribuida en América, África y el Medio Oriente, mientras que, *S. haematobium*, *S. intercalatum* y *S. guineensis* sólo se presentan en África, así como *S. japonicum* y *S.*

mekongi, sólo se encuentran en el sureste asiático (3). En América, *S. mansoni* se encuentra en Brasil, Surinam, Venezuela y algunas islas de la Antillas (4). En Venezuela, su distribución esta limitada a la región centro norte costera del país (Estados Aragua, Carabobo, Miranda y Guárico) y un pequeño foco en el occidente del país en la confluencia de los estados Lara, Trujillo y Portuguesa (5,6). Venezuela es considerado un país hipoendémico donde predominan las bajas cargas parasitarias (80% de los infectados eliminan <100 huevos por g de heces), sin embargo se ha estimado que hay no menos de 50.000 personas infectadas (7).

Control de la endemia.

El control de esta endemia ha sido orientado a la eliminación de los caracoles que actúan como huéspedes intermediarios utilizando molusquicidas químicos y biológicos. Sin embargo, también se han aplicado medidas de ingeniería sanitaria que limitan la contaminación de los cuerpos de agua con heces de personas eliminando huevos del parásito y la quimioterapia. Los éxitos iniciales obtenidos con estas medidas, han retrocedido debido a: i) cambios ambientales inducidos por el hombre (construcción de represas de uso agrícola e hidroeléctrico que garantizan criaderos extensos y permanentes de los moluscos vectores, canales de irrigación, etc.); ii) la dispersión de los vectores (*Biomphalaria glabrata*, la especie autóctona de América ha sido introducida en el sur del Brasil y en Egipto); iii) la resistencia de los vectores a los molusquicidas; iv) los desplazamientos y asentamientos humanos hacia áreas de riesgo, sumados a; v) la inexistencia de tratamiento de aguas servidas y aguas blancas; vi) la pobreza; vii) el incremento en la participación de reservorios silvestres en algunas áreas endémicas de Brasil y de las Antillas, así como a; viii) las evidencias crecientes de "tolerancia" al único esquema de tratamiento actual con Praziquantel para la mayoría de las especies (8,9). De allí la necesidad de desarrollar y aplicar medidas de control alternativas como son las vacunas (10).

Características de los parásitos.

Los esquistosomas son organismos muy particulares ya que además de ser los únicos platelmintos de sexos separados, son longevos, pudiendo vivir más de 30 años. Son verdaderos hemoparásitos y la mayoría de las especies vive en el sistema porto-mesentérico. Este parásito dispone de un complejo sistema de mecanismos de evasión contra el sistema inmune del hospedador: presenta mimetismo antigénico al recubrirse con moléculas del hospedador; habita un área del organismo de tolerancia inmunológica, como lo es el sistema porto-mesentérico; presenta una doble membrana plasmática (heptalaminar) que le permite "descamar" áreas cubiertas con anticuerpos; exhibe proteasas en su tegumento que hidrolizan anticuerpos; posee un rico sistema de enzimas anti-tóxicas que neutralizan radicales de oxígeno (glutathion-S-transferasa, superóxido dismutasa, glutathion peroxidasa, tioredoxina, etc) y componentes inmunosupresores (CIC, consumo de complemento, compuestos antiinflamatorios de los esquistosómulo, como es el caso de prostaglandinas (PGD2) producidas por el parásito que inhiben e inmovilizan a las células dendríticas, etc.) (11,12,13,14).

Por otra parte, su capacidad adaptativa es enorme, ya que de vivir en un caracol, es capaz de pasar al agua en pocos minutos e inmediatamente habitar en el torrente circulatorio de mamíferos.

Respuesta inmune y patología.

Son tres los estadios a los que se expone el humano como

hospedador definitivo, la cercaria-esquistosómulo, los adultos y los huevos. En términos de la patología, son los huevos los responsables del daño tisular representado por los granulomas bilharzianos que consiste en una reacción inflamatoria concéntrica alrededor de los huevos, que afecta principalmente al intestino y al hígado (15,16). Por el contrario, en términos de protección, el estadio vulnerable es el esquistosómulo, particularmente en las primeras 72 horas de la penetración. Los esquistosómulo -después de este período inicial- y los vermes adultos, son prácticamente invulnerables a los mecanismos protectores y la única evidencia de protección está asociada a la disminución de su fecundidad (17,18,14).

Las evidencias sobre mecanismos efectores contra este parásito, están limitadas a estudios "in vitro" e "in vivo" en animales experimentales. Las evidencias en humanos son indirectas y basadas en estudios inmunoepidemiológicos (19,20,21). Hasta ahora todo parece indicar que los anticuerpos, particularmente de las clases IgE, IgG1, IgG3 e IgA, participan, asociados a células tales como eosinófilos, macrófagos, plaquetas y eventualmente neutrófilos a través de mecanismos de citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (antibody dependent cytotoxicity-ADCC) y en menor grado por complemento y algunas citokinas (TNF alfa y FNT) que estimulan la liberación de radicales de oxígeno, etc (14,22).

Moléculas blanco para el desarrollo de vacunas.

Los estudios llevados a cabo inmunizando con cercarias atenuadas por irradiación o fármacos, si bien se han utilizado como patrón oro de eficacia al alcanzar un 91% de protección, hacen imposible su aplicación en poblaciones en riesgo. De allí la necesidad de desarrollar moléculas o fracciones de las mismas con capacidad inmunoprotectora (23,24).

Varias moléculas han sido identificadas como blancos de la inmunidad protectora anti-esquistosoma, siendo la mayoría de ellas moléculas de conocida actividad biológica. Su potencial como vacunas ha sido evaluado en diferentes modelos animales (25,26,27,28,29) y sólo una de ellas ha llegado a experimentarse en humanos, la GST-28 (14). En la Tabla 1 se resume el grupo de moléculas estudiadas, su función, ubicación topográfica, modelos animales evaluados, tipos de antígeno y eficacia protectora. Es de hacer notar que la gran mayoría de las moléculas evaluadas hasta ahora, no supera el 50% de eficacia, denotando la necesidad de buscar nuevos blancos inmunológicos y que eventualmente se requiera utilizar mezclas de moléculas o de epítopes derivados de las mismas (30,31). Una de las estrategias particulares contra estos parásitos, son las vacunas anti-fecundidad, que persiguen, más que eliminar a los vermes adultos, limitar la oviposición y en consecuencia la patología inducida por los huevos (14).

Moléculas evaluadas en este estudio.

En base a los resultados obtenidos previamente por otros autores, nos hemos propuesto identificar otras moléculas que median protección y para ello hemos seguido las tres estrategias resumidas en la Tabla 2, usando el modelo ratón para este fin y como inmunógenos, péptidos sintéticos polimerizables (32). Una vez seleccionadas las moléculas a evaluar, se utilizaron algoritmos predictivos para determinar las regiones hidrofílicas y expuestas. En caso de contar con la molécula cristalizada, se optó por seleccionar las áreas circundantes al sitio activo, de manera que los anticuerpos inducidos pudieran impedir la hidrólisis del sustrato respectivo, al ocupar el sitio de acceso por competencia estérica (33,27).

Tabla 1. Antígenos como Vacunas contra la Esquistosomiasis mansoni.

Antígeno	Tipo	kDa	Localización	Estadio	Descripción	Modelo	Protección %	Referencia
Glutation S - Transferasa Sm28 GST	Péptido sintético MAP – 8 Recombinante	28	Protonefridios Parénquima Tegumento	Adulto Esquistosómulo Huevo	Enzima	Ratón Rata Hámster	30-60	25,26
Paramiosina	Recombinante	97	Músculo Tegumento	Adulto Esquistosómulo	Proteína del Músculo	Ratón Rata	30	40
IrV5 Antígeno Vacuna Irradiada	Recombinante	62	Tegumento Músculo	Adulto Esquistosómulo Huevo	Proteína del Músculo	Ratón	50-70	41
Triosa – fosfo – isomerasa Sm28TPI	Péptido sintético MAP – 4	28	Tegumento Parénquima	Adulto Esquistosómulo Huevo	Enzima	Ratón	30-60	42
Sm23	Péptido sintético MAP – 3 cDNA	23	Tegumento	Adulto Esquistosómulo Huevo	Proteína Integral de membrana	Ratón	40-50 31-34	43,44
Asparaginil endopeptidasa Sm32	Recombinante	32	Tubo digestivo Protonefridios	Adulto Esquistosómulo Huevo, Cercaria	Enzima	Ratón	37-53	45,46,47
Sm14	Recombinante	14	Tubo digestivo Tegumento	Adulto Esquistosómulo Huevo	Proteína de unión a Ácidos grasos	Ratón	67(en ratones heterocigotos)	28,48,49,50,51
G3PDH	Péptido sintético MAP	37	Tegumento Parénquima	Adulto Esquistosómulo Huevo, Cercaria	Proteína citosólica (glucólisis)	Ratón	20-45	31
SOD GPX	cDNA Virus Vaccinia Recombinantes	NR	Tegumento	Adulto	Enzimas antioxidantes	Ratón	22-60 23-85	22

Tabla 2. Estrategias para el desarrollo de vacunas contra *Schistosoma mansoni*.

1. Reconocimiento diferencial entre hospedadores no permisivos vs permisivos.
2. Bloqueo de moléculas funcionales presentes tanto en adultos como en la cercaria/esquistosómulo.
 - Enzimas responsables de la nutrición y metabolismo (catepsina B y D, asparaginil endopeptidasa, TPI).
 - Enzimas responsables de la detoxificación (GST – 28, tioredoxina).
 - Enzimas involucradas en la invasión tisular (elastasa, catepsina B,).
3. Reconocimiento y alteración de moléculas estructurales particularmente presentes en membranas.
 - Paramiosina.

Como fuente de antígeno se utilizaron péptidos sintéticos obtenidos químicamente por la estrategia T-boc y en forma polimerizable, ya que los mismos presentaban CG y GC en los extremos amino y carboxi-terminal, a fin de generar polímeros que habitualmente son más inmunogénicos que las estructuras monoméricas (34,35,36). Péptidos de GST-28, triosa-fosfo-isomerasa (TPI-28) y asparaginil endopeptidasa (Sm32), elastasa, catepsina B (Sm31), catepsina D y catepsina L, fueron evaluados individualmente o en mezclas, inyectándolos por vía subcutánea y utilizando Adyuvante Completo (ACF) e Incompleto de Freund (AIF). La mayoría de los péptidos fueron inmunogénicos al reconocer, no sólo a los péptidos inmunizantes, sino también a la molécula originaria (36,37,38). Adicionalmente, algunos de los péptidos que han mostrado capacidad protectora son reconocidos por otras especies de esquistosomas, indicando la posibilidad de inducir

protección cruzada interespecies (39). Una vez inmunizados, los ratones se expusieron a 100 cercarias de *S. mansoni* y la eficacia protectora se determinó en base al análisis comparativo con los ratones controles, utilizando diferentes parámetros tales como: número de vermes, número de huevos en tejido, en heces, fecundidad, etc.

De las moléculas de *S. mansoni* evaluadas, hemos tenido consistentes resultados de protección superiores al 50%, con mezclas de péptidos derivados de la GST-28 y de la TPI-28, y muy en particular de la Sm32. Estos resultados sumados a otras moléculas actualmente en estudio, permiten evidenciar el potencial de los péptidos sintéticos como inmunógenos en la esquistosomiasis, que necesariamente deberán ser reevaluados en otras especies animales antes de intentar su aplicación en humanos. Finalmente, vale la pena destacar lo promisorio de esta investigación, pues hasta ahora han sido escasos los estudios que hayan mostrado, en animales de laboratorio, niveles de eficacia comparables a los obtenidos en este proyecto y particularmente utilizando péptidos sintéticos.

AGRADECIMIENTOS

A colaboradores que han participado en alguna de las fases de esta investigación: Nathalie Chacón, Cecilia Colmenares, Fanny Guzmán, Lisbeth Medina, Johan Hoebeke, Laurence Sabatier, Italo Césari, César Matos.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization, WHO. Fact Sheet 115, 1996.
2. Bergquist NR. Schistosomiasis: from risk assessment to control. Trends Parasitol. 2002 18(7):309-14.
3. Kojima, S. Schistosomes. En: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections Parasitology. 9 th Edition. Eds: Cox, F., Kreier, J., Wakelin, D. Arnold, London. 1998 pp: 479-505.

4. OMS. Control de la esquistosomiasis. Serie de Informes Técnicos 830. 1993.
5. Alarcón de Noya, B., Balzán, C., Arteaga, C., Cesari, I. and Noya, O. The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: features and evolution. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1999; 94: 139-146.
6. Alarcón de Noya B, Ruiz R, Colmenares C, Losada S, Cesari IM, Toro J, Noya O. Schistosomiasis mansoni in areas of low transmission: epidemiological characterization of Venezuelan foci. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97 Suppl 1:5-10.
7. Grupo de Investigación en Esquistosomiasis, Informe Técnico, Venezuela, 1996.
8. Rey L. Schistosoma e Esquistosomiasis: Epidemiología e Controle . Em Parasitología 3° Edición. Ed. Rey L., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro; 2001; pp: 455-479.
9. Danso-Appiah A, De Vlas SJ. Interpreting low Praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. Trends Parasitol. 2002; 18(7):294.
10. Capron A, Riveau G, Grzych JM, Boulanger D, Capron M, Pierce R. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. Memo Inst Oswaldo Cruz 1995; 90: 235-240.
11. Capron, A. Schistosomiasis: Forty years' war on the worm. Parasitol. Today 1998; 14(10): 379-384.
12. Angeli, V., Faveeuw C., Roye O., Fontaine J., Teissier E, Capron A., et al, Trottein F. Role of the parasite-derived PGD2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. J. Exp. Med. 2001; 193, 1135-1147.
13. Ramaswamy, K., Kumar P., He Y. A role for parasite-induced PGE2 in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J. Immunol 2000; 165:4567-4574.
14. Capron A., Riveau G., Capron M. and Francois T. Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. Trends Parasitol 2005; 21: 143-149.
15. Smithers S.R, and M.J. Doenhoff.. Schistosomiasis, p. 527-607. In S. Cohen and K.S. Warren (ed.), Immunology of parasitic diseases. Blackwell Scientific. Oxford, England. 1982.
16. Boros, D.I.. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. Clin. Microbiol. Rev. 1989; 2: 250-269.
17. Bergquist NR. Schistosomiasis vaccine: Research to development. Parasitol Today 1998; 14: 99-101.
18. Chen YX, Yi XY, Zeng XF, Yuan SS, Zhang SK, McReynolds L. Molecular cloning, expression and vaccination of a novel gene Sj-MA of *Schistosoma japonicum*. Acta Biochim Biophys Sin, 2003; 35: 981-985.
19. Mutapi F, Hagan P, Woolhouse ME, Mdluzza T, Ndhlovu PD. Chemotherapy-induced, age-related changes in antischistosome antibody responses. Parasite Immunol. 2003 Feb; 25(2):87-97.
20. Hagan, P., Blumenthal U.J., Dunn D, Simpson AJ, Wilson A. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. Nature 1991; 349:243-245.
21. Butterworth A., Dunne D., Fulford A., Thorne K., Gachuhi K., Ouma J., et al. Human immunity to *Schistosoma mansoni*: observations on mechanisms, and implications for control. Immunol. Invest. 1992; 21: 391-407.
22. Shalaby, K., Yin L., Thakur A., Christen L., Niles E., Lo Verde P. Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA Vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. Vaccine 2003; 22: 130-136.
23. James SL. Experimental models of immunization against schistosomes: lessons for vaccine development. Immunol Invest. 1992; 21(5):477-93.
24. Noya O., Alarcón de Noya B., Cesari I. Estado actual y perspectivas de vacunas antihelmínticas. El modelo esquistosomiasis. En Parasitología Molecular. Eds. Luis Rivas López y Manuel Carlos López. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. 1993.
25. Wolowczuk I, Auriault C, Bossus M, Boulanger D, Gras-Masse H, Mazingue C, et al., Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28 GST antigen in rat, mouse, and monkey. 1. Partial protection of Fischer rat after active immunization. J Immunol. 1991 146 (6): 1987-95.
26. Boulanger D, Warter A, Trottein F, Mauny F, Bremond P, Audibert F, et al. Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S. mansoni*. Parasite Immunol. 1995; 17(7):361-9.
27. Harn DA, Gu W, Oligino LD, Mitsuyama M, Gebremichael A, Richter D. A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of schistosome triose-phosphate isomerase. J Immunol. 1992.; 148(2):562-7.
28. Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, et al. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93 (1): 269-73.
29. Riveau G, Poulain-Godefroy OP, Dupre L, Remoue F, Mielcarek N, Loch C, et al. Glutathione S-transferases of 28 kDa as major vaccine candidates against schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1998, 93: 87-94.
30. Bergquist NR. Controlling schistosomiasis by vaccination: a realistic option? Parasitol Today 1995; 11: 191-194.
31. Tallima H., Montash M., Veprek P., Velek J., Jezek J. El Ridi R. Differences in immunogenicity and vaccine potencial of peptides from *Schistosoma mansoni* glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase. Vaccine 2003. 21:3290-3300.
32. Capron A, Capron M, Dombroweiez D, Rivear G. Vaccine strategies against schistosomiasis: From concepts to clinical trials. Int Arch Allergy Immunol, 2001; 124: 9-15.
33. Xu CB, Verwaerde C, Grzych JM, Fontaine J, Capron A.. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. Eur J Immunol. ; 8: 1801-1807.
34. Borrás-Cuesta F, Fedon Y, Petit-Camurdan A. Enhancement of peptide immunogenicity by linear polymerization. Eur J Immunol. 1988; 18 (2): 199-202.

35. Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzman F, Romero P, et al., A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 1988, 10;332(6160):158-61.
36. Noya O., Patarroyo M., Guzmán F., Alarcón de Noya B. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Current.. Prot. Pept. Sci.* 2003. 4:299-308.
37. Noya O., Alarcón de Noya B., Guzmán F., Bermúdez H. Immunogenicity of Sm32 synthetic peptides derived from the *Schistosoma mansoni* adult worm. *Immunol. Lett.* 2003; 88:211-219.
38. Chacón N., Losada S., Bermúdez H., Césari I., Hoebeke J., Noya O. Immunogenicity of polimerizable synthetic peptides derived from a vaccine candidate against schistosomiasis: the asparaginyl endopeptidase (Sm32). *Immunol. Lett.* 2003; 88:199-210.
39. Losada S., Chacón N., Colmenares C., Bermúdez H., Lorenzo M., Pointier J.P., et al., Schistosoma: cross-reactivity and antigenic community among different species. *Exper. Parasitol.* 2005;111:182-190.
40. Pearce EJ, James SL, Hiery S, Lanar DE, Sher A. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(15):5678-82.
41. Soisson LM, Masterson CP, Tom TD, McNally MT, Lowell GH, Strand M. Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J Immunol.* 1992;149(11):3612-20.
42. Reynolds, S.R., Dahl, C.E. and Harn, D.A. T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose phosphate isomerase. *J. Immunol.* 1994;152: 193-200.
43. Reynolds SR, Shoemaker CB, Harn DA. T and B cell epitope mapping of SM23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol.* 1992;149(12):3995-4001.
44. Da'dara AA, Skelly PJ, Wang MM, Harn DA. Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice. *Vaccine.* 2001;20(3-4):359-69.
45. Chen Y, Yi X, Zeng X, Wang S. *Schistosoma japonicum*: antifecundity immunity induced by adult worm derived 31/32 kDa antigens in mice. *Chin J Schist Control.* 1995, 7: 72-74.
46. Chlichlia K, Bahgat M, Ruppel A, Schirmacher V. DNA vaccination with asparaginyl endopeptidase (Sm32) from the parasite *Schistosoma mansoni*: anti-fecundity effect induced in mice. *Vaccine.* 2001; 20 (3-4): 439-47.
47. Skelly P.J. and Shoemaker C.B. *Schistosoma mansoni* proteases Sm31 (Cathepsin B) and Sm32 (legumain) are expressed in the cecum and protonephridia of cercariae. *J. Parasitol.* 2001;87(5):1218-21.
48. Thaumaturgo N, Vilar MM, Edelenyi R, Tendler M. Characterization of Sm14 related components in different helminths by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97 Suppl 1:115-6.
49. Brito CF, Oliveira GC, Oliveira SC, Street M, Riengrojpitak S, Wilson RA, et al., Sm14 gene expression in different stages of the *Schistosoma mansoni* life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(3): 377-81.
50. Ribeiro F, Vieira Cdos S, Fernandes A, Araujo N, Katz N. The effects of immunization with recombinant Sm14 (rSm14) in reducing worm burden and mortality of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35 (1): 11-7.
51. Tendler M, Vilar MM, Brito CA, Freire NM, Katz N, Simpson A. Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995; 90 (2): 255-6.