



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

MÁSTER EN ENFERMEDADES TROPICALES

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Curso 2019-2020

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS FORMAS JUVENILES DE
FASCIOLA HEPATICA Y EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO DEL HOSPEDADOR

Judit Serrat Fernández

SALAMANCA 2020

El presente Trabajo de Fin de Máster es, a mi leal saber y entender, original y mi propio trabajo, excepto los agradecimientos en el texto. El presente Trabajo de Fin de Máster no ha sido presentado, ni en todo, ni en parte, para un título en esta o en cualquier otra Universidad.

Este Trabajo de Fin de Máster se presenta en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MÁSTER EN ENFERMEDADES TROPICALES
Universidad de Salamanca

Por

Judit Serrat Fernández

Julio 2020

Firma estudiante:

Visto Bueno Tutor:

Dr. Javier González Miguel - Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC)

Dr. Fernando Simón Martín - Universidad de Salamanca

RESUMEN

La fasciolosis humana es una infección parasitaria de transmisión alimentaria causada por trematodos del género *Fasciola* y clasificada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida. El aumento en el número de casos humanos infectados por *F. hepatica* en las últimas décadas, así como la aparición de resistencias al fármaco de elección, el triclabendazol, generan la necesidad de desarrollar herramientas de control más efectivas. Las estrategias de control en la fasciolosis han sido llevadas a cabo principalmente incluyendo antígenos de las fases adultas del parásito en la formulación y, por lo tanto, ejercerían su hipotética función protectora una vez la infección ya se ha establecido. Los vermes adultos de *F. hepatica*, al igual que otros parásitos helmintos, explotan la capacidad proteolítica de su hospedador vertebrado mediante la interacción con el sistema fibrinolítico, con el fin de facilitar sus procesos de migración, evasión y supervivencia. Si este es el caso de los vermes juveniles de *F. hepatica* es algo que todavía no se ha demostrado, pese a que son estas formas inmaduras las que realizan los principales procesos migratorios durante la infección. En el presente Trabajo de Fin de Máster se revisa el estado actual de la fasciolosis y del sistema fibrinolítico del hospedador, se analizan bibliográficamente los mecanismos que rigen la interacción entre endoparásitos del ser humano y dicho sistema, y se demuestra experimentalmente que los vermes juveniles de *F. hepatica* son capaces de interactuar con la ruta fibrinolítica mediante la unión de plasminógeno en su tegumento. Este hallazgo está en línea con el futuro desarrollo de estrategias de control de la fasciolosis más efectivas y sostenibles, basadas en la interrupción temprana de la progresión de la infección mediante el bloqueo de la capacidad migratoria de los vermes juveniles.

ABSTRACT

Human fascioliasis is a food-borne zoonotic infection caused by trematodes of the genus *Fasciola* and classified by the World Health Organization as a neglected tropical disease. Human cases of *F. hepatica* infection and reports of resistance to the standard treatment, triclabendazole, have been increasingly reported in the last years, which raise the need for the development of better drugs and control strategies for this disease. Yet, fascioliasis control efforts developed so far, including vaccination, have been centered in the adult stages of the parasite, and thus they tackle the disease when it has already been fully established. Adult worms of *F. hepatica*, as many other parasitic helminths, co-opt the function of the mammalian fibrinolytic system in order to migrate and survive inside the vertebrate host, and whether this is also the case for *F. hepatica* newly excysed juvenile flukes is still an open question. This Master's thesis reviews the current knowledge on fascioliasis and the vertebrate fibrinolytic system, provides a bibliographic review that pinpoints the importance of the interaction between human endoparasites and the fibrinolytic system of the vertebrate hosts and includes an experimental study that demonstrates the ability of *F. hepatica* newly excysed juveniles to bind plasminogen at their tegument surface. This finding paves the way for the development of more effective and sustainable fascioliasis control strategies aimed at preventing disease progression by blocking the migration of juvenile flukes.

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido	1
Índice de tablas	2
Lista de abreviaturas	3
Introducción	4
Objetivos.....	5
Metodología	6
OBJETIVO 1: INTRODUCCIÓN A LA FASCIOSIS HUMANA CON ESPECIAL ATENCIÓN A LAS FASES JUVENILES.....	7
1.1. <i>Fasciola hepatica</i> : taxonomía, morfología y ciclo biológico	7
1.2. Epidemiología de la fasciolosis	9
1.3. Patología y clínica de la fasciolosis.....	9
1.4. Diagnóstico de la fasciolosis	10
1.5. Tratamiento y control de la fasciolosis	11
1.6. Relación FhNEJ/hospedador: el punto de “no retorno” de la fasciolosis	13
OBJETIVO 2: EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO DE LOS HOSPEDADORES VERTEBRADOS	16
2.1. El sistema fibrinolítico como parte del sistema hemostático.....	16
2.2. Funciones y componentes principales del sistema fibrinolítico.....	17
2.2.1. El plasminógeno	17
2.2.2. Receptores del plasminógeno	18
2.2.3. Activadores del plasminógeno	20
2.2.4. Inhibidores de la fibrinólisis	22
2.2.5. El papel de la plasmina	22
OBJETIVO 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE LA INTERACCIÓN DE ENDOPARÁSITOS DEL SER HUMANO CON EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO DE SUS HOSPEDADORES	24
3.1. Introducción	24
3.2. Metodología	24
3.3. Discusión	26
3.3.1. Proteínas parasitarias que interaccionan con el sistema fibrinolítico	26
3.3.2. Mecanismos de interacción entre las proteínas parasitarias y el sistema fibrinolítico de sus hospedadores	30
3.3.3. Localización de las proteínas de interacción con el sistema fibrinolítico de los hospedadores	31
3.3.4. Equilibrio entre supervivencia del parásito y patogénesis en el hospedador	32
3.3.5. Proteínas de interacción con el sistema fibrinolítico como candidatas para el desarrollo de vacunas antiparasitarias	33
3.4. Comentarios finales.....	33

OBJETIVO 4: ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA INTERACCIÓN DE LAS FASES JUVENILES DE *FASCIOLA HEPATICA* CON EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO DE SU HOSPEDADOR.....36

4.1. Materiales y métodos 36

4.1.1. Excistación de metacercarias de *F. hepatica* y obtención de las fases juveniles 36

4.1.2. Obtención de los extractos antigénicos..... 36

4.1.3. Ensayo de unión a plasminógeno 37

4.1.4. Análisis estadístico 37

4.2. Resultados..... 38

4.2.1. El extracto de tegumento de FhNEJ fija plasminógeno 38

4.2.2. La unión de FhNEJ-Teg a plasminógeno depende de residuos de lisina..... 38

4.2.3. El extracto de tegumento de FhNEJ fija plasminógeno de forma proporcional a la cantidad de PLG disponible 39

4.3. Discusión y perspectivas futuras 40

Conclusiones43

Bibliografía44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ensayos vacunales realizados hasta el momento actual con antígenos de las fases juveniles de *Fasciola hepatica*..... 13

Tabla 2. Proteínas expresadas por endoparásitos del ser humano relacionadas con el sistema fibrinolítico de los hospedadores vertebrados identificadas entre 2010 y 2020. 27

Tabla 3. Ensayos de vacunación con proteínas de endoparásitos del ser humano que interaccionan con el sistema fibrinolítico de los hospedadores publicados entre 2010 y 2020. 33

LISTA DE ABREVIATURAS

a2-AP	alfa-2-antiplasmina
ε-ACA	ácido ε-aminocaproico
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ETDs	enfermedades tropicales desatendidas
E/S	excretados/secretados (antígenos)
FBAL	fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa
FhCB	Catepsina B de <i>Fasciola hepatica</i>
FhCL	Catepsina L de <i>F. hepatica</i>
FhNEJ	juvenil recién excistado (<i>newly excysted juvenile</i>) de <i>F. hepatica</i>
FhNEJ-Teg	antígeno de tegumento de juveniles recién excistados de <i>F. hepatica</i>
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HD	hospedador definitivo
HI	hospedador intermediario
Hsp60	proteína de choque térmico (<i>heat-shock protein</i>) 60
LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i>
LACK	receptor de quinasa C activada de <i>Leishmania</i>
MMP	metaloproteasa de matriz
OPB	oligopeptidasa B
PA	activador de plasminógeno
PAI	inhibidor de los activadores del plasminógeno
PLG	plasminógeno
PLG-R	receptor de plasminógeno o proteína de unión a plasminógeno
SMP-1	proteína pequeña miristoilada (<i>small myristoylated protein</i>) 1
SmSP2	proteasa de serina 2 de <i>Schistosoma mansoni</i>
SmVAL18	<i>venom allergen-like protein</i> 18 de <i>S. mansoni</i>
TAFI	inhibidor de fibrinólisis activado por trombina
TCBZ	triclabendazol
TsSPI	inhibidor de proteasas de serina (<i>serin-protease inhibitor</i>) de <i>Trichinella spiralis</i>
t-PA	activador tisular del plasminógeno
u-PA	activador del plasminógeno de tipo uroquinasa
u-PAR	receptor de u-PA asociado a glicosilfosfatidilinositol

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades tropicales desatendidas (ETDs) son un grupo de 20 enfermedades infecciosas que afectan a más de un billón y medio de personas en el mundo. Las personas afectadas por ETDs suelen vivir en zonas de bajos recursos y, si bien en general, estas enfermedades no presentan altas tasas de mortalidad, generan importantes morbilidades que interfieren con las actividades económicas de las personas afectadas, exacerbando así el círculo vicioso de la pobreza (1). La mayoría de ETDs están causadas por parásitos helmintos y, de hecho, se estima que más de un billón de personas en zonas de bajos recursos de África sub-sahariana, Asia y América Central y del Sur están infectadas por uno o más de estos parásitos. Actualmente siguen existiendo muchos retos para el control de las enfermedades tropicales causadas por helmintos, entre otras, el auge de resistencias a los tratamientos farmacológicos de elección, una baja disponibilidad de técnicas de diagnóstico específicas, sensibles y apropiadas para su uso en zonas endémicas y un bajo conocimiento de las relaciones que establecen los parásitos helmintos con sus hospedadores (2). Junto con medidas estructurales basadas esencialmente en la provisión de infraestructuras para el saneamiento de agua (3), el desarrollo de vacunas contra parásitos helmintos supone una estrategia de control sostenible y respetuosa con los ecosistemas y, por lo tanto, una de las herramientas más efectivas a largo plazo para erradicar estas enfermedades.

Una de las enfermedades tropicales cuya importancia sanitaria está en aumento en las últimas décadas es la fasciolosis humana. La fasciolosis es una enfermedad parasitaria causada por helmintos trematodos de las especies *Fasciola hepatica* y *F. gigantica* clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como ETD dentro del grupo de trematodiasis alimentarias (4). El ser humano se infecta principalmente mediante la ingestión de metacercarias, las formas infectivas del parásito, que se encuentran en agua o adheridas a plantas acuáticas contaminadas incluidas en la dieta. Si bien es cierto que *F. hepatica* es un caso particular, ya que su distribución geográfica no está restringida a zonas tropicales, los casos de infección humana siguen concentrándose en países de bajos ingresos y, de hecho, en regiones hiper-endémicas las personas afectadas suelen vivir en condiciones higiénico-sanitarias muy limitadas (falta de disponibilidad de letrinas y de sistemas de separación de aguas residuales) (5).

El tratamiento de elección para la fasciolosis es el triclabendazol (TCBZ), pero un incremento en el número de casos reportados resistentes a este fármaco (6) hace que el desarrollo de otras medidas de control, entre ellas vacunas, sea de vital importancia para una gestión correcta de esta enfermedad, especialmente en zonas endémicas donde la población tiene un mayor riesgo de infectarse y de sufrir morbilidades más graves. Sin embargo, los ensayos vacunales llevados a cabo hasta el momento frente a *F. hepatica* no han generado un porcentaje de protección lo suficientemente elevado. La mayor parte de estos experimentos se han basado en el empleo de antígenos derivados de los vermes adultos del parásito, es decir, se dirigen a una fase evolutiva de gran complejidad antigénica, cuya localización definitiva, los canales biliares intra-hepáticos, representa un nicho de difícil acceso al sistema inmune del hospedador. Ante este escenario, una

estrategia vacunal dirigida hacia fases evolutivas más tempranas del parásito podría ser efectiva en el control de la fasciolosis.

Una vez ingeridas las metacercarias por el hospedador vertebrado, los juveniles recién excistados de *F. hepatica* (FhNEJ) emergen en el duodeno, lo atraviesan y comienzan un complejo proceso de migración que conduce a los vermes inmaduros hasta los conductos biliares, donde los adultos maduran sexualmente y empiezan a producir huevos que son liberados con las heces. La migración intra-orgánica es una característica ampliamente establecida en los ciclos biológicos de los parásitos helmintos al conferir a sus fases inmaduras importantes ventajas evolutivas (7). Estos procesos migratorios se ven facilitados por la acción de antígenos parasitarios secretados del tipo proteasa, cuya actividad proteolítica permite la degradación de los distintos componentes tisulares del hospedador. No obstante, y con el objetivo de llevar a cabo el proceso de migración intra-orgánica de una forma más eficiente en términos de gasto energético, la capacidad para explotar la actividad proteolítica del hospedador vertebrado en su propio beneficio ha sido demostrada en un importante número de agentes infecciosos, entre ellos parásitos helmintos. Un ejemplo paradigmático de estos mecanismos es la interacción de grupos de patógenos tisulares y/o hemáticos con el sistema fibrinolítico del hospedador mediante la expresión de receptores de su enzima principal, el plasminógeno (PLG), y su posterior conversión a la proteasa catalíticamente activa, la plasmina (8). Este importante proceso ha sido recientemente demostrado en los vermes adultos de *F. hepatica* (9,10), pero es desconocido hasta la fecha si las formas juveniles del parásito podrían valerse de estrategias similares para llevar a cabo su proceso de migración intra-orgánica.

El objetivo del presente trabajo es aumentar el conocimiento de las relaciones parásito/hospedador en la fasciolosis en una fase temprana de la infección, concretamente estudiando la interacción entre los FhNEJ y el sistema fibrinolítico de su hospedador, con el fin de facilitar la futura identificación de moléculas parasitarias con potencial para el desarrollo de tratamientos y técnicas de diagnóstico y control (entre ellas, vacunas) que permitan abordar la enfermedad antes de que las fases adultas hayan alcanzado su localización definitiva. Para ello, se abordará este objetivo desde una perspectiva bibliográfica, revisando el estado actual de la fasciolosis humana y del sistema fibrinolítico, así como actualizando las características de la interacción de los endoparásitos del ser humano con la fibrinólisis; y experimental, mediante el análisis de la capacidad de los FhNEJ para fijar PLG.

OBJETIVOS

El presente trabajo se divide en 4 objetivos específicos:

1. Introducción a la fasciolosis humana con especial atención a las fases juveniles de *F. hepatica*.
2. El sistema fibrinolítico de los hospedadores vertebrados.
3. Revisión bibliográfica sobre la interacción de endoparásitos del ser humano con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores.
4. Estudio experimental sobre la interacción de las fases juveniles de *F. hepatica* con el sistema fibrinolítico de su hospedador.

El **Objetivo 1** pretende visibilizar la importancia de la fasciolosis humana como enfermedad emergente y proporcionar información sobre la biología, epidemiología, patología, diagnóstico, control y relaciones parásito/hospedador de uno de sus agentes etiológicos, *F. hepatica*. Se revisan, además, con especial relevancia dichos aspectos en relación con las fases juveniles del parásito. El trabajo gira entorno a la fasciolosis causada por *F. hepatica* dada la amplia distribución geográfica de este parásito y su mayor capacidad de colonizar nuevos ambientes en comparación con *F. gigantica*.

El **Objetivo 2** proporciona una descripción detallada del funcionamiento del sistema fibrinolítico de los vertebrados con el propósito de comprender los mecanismos y moléculas implicadas en su correcto funcionamiento, ya que, potencialmente, podrían ser beneficiosos para los parásitos que explotan las funciones proteolíticas de este sistema.

En relación con el anterior, el **Objetivo 3** consiste en una revisión bibliográfica en la que se analizan de forma sistemática todos los artículos publicados en los últimos 10 años relacionados con la interacción de endoparásitos del ser humano con la fibrinólisis, con el fin de actualizar el conocimiento que se tiene sobre los beneficios que obtienen estos agentes infecciosos cuando interactúan con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores vertebrados.

Finalmente, el **Objetivo 4** pretende elucidar si los FhNEJ son capaces de unir PLG en su superficie y potencialmente estimular la generación de plasmina, lo que confirmaría que la utilización de las funciones fibrinolíticas del hospedador es un mecanismo no restringido a las fases adultas del parásito, sino que ocurre también en las fases más tempranas de la infección.

METODOLOGÍA

Los **Objetivos 1 y 2** se han llevado a cabo mediante la búsqueda de fuentes bibliográficas relevantes en cada uno de los ámbitos de estudio. Estas fuentes incluyeron libros y artículos y revisiones científicas publicadas en revistas indexadas y listados en la base de datos *PubMed*.

Para la revisión bibliográfica del **Objetivo 3** se buscaron los artículos publicados entre 2010 y 2020 en la base de datos *PubMed* (último acceso en marzo de 2020) bajo los términos de búsqueda “*parasite*” más “*fibrinolysis*”, “*fibrinolytic system*”, “*plasmin*” o “*plasminogen*”. Después de eliminar duplicidades y de un riguroso escrutinio de cada uno de los artículos obtenidos, 38 artículos fueron incluidos en la revisión. La metodología empleada para la ejecución de esta revisión bibliográfica está descrita con más detalle en la [Sección 3.2](#).

La metodología empleada en la ejecución del **Objetivo 4** consiste en técnicas de laboratorio diversas, incluyendo la excistación *in vitro* de metacercarias de *F. hepatica*, la recuperación de antígenos superficiales de los FhNEJ y varios ensayos de tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) para determinar la unión de éstos al PLG. Los protocolos correspondientes a cada una de estas técnicas están descritos con más detalle en la [Sección 4.1](#).

OBJETIVO 1: INTRODUCCIÓN A LA FASCIOLISIS HUMANA CON ESPECIAL ATENCIÓN A LAS FASES JUVENILES

1.1. *Fasciola hepatica*: taxonomía, morfología y ciclo biológico

Fasciola hepatica es un helminto trematodo perteneciente al filo *Platyhelminthes*, clase *Trematoda*, subclase *Digenea*, orden *Echinostomida* y familia *Fasciolidae* (11). Esta familia contiene nueve especies, tres de las cuales son capaces de causar infecciones en humanos: *F. hepatica* y *F. gigantica*, agentes etiológicos de la fasciolosis, y *Fasciolopsis buski*, causante de fasciolopsiosis (12). Morfológicamente, los vermes adultos de trematodos digeneos son planos y presentan simetría bilateral dorsoventral. Estos organismos son hermafroditas y tienen dos ventosas, una oral y otra ventral, que utilizan para adherirse al hospedador, concretamente a la pared de los conductos biliares intra-hepáticos en el caso de *F. hepatica* (11,13) (Figura 1). Además, estos organismos carecen de sistemas circulatorio y respiratorio, y están revestidos por el tegumento, que es un epitelio sincitial (una estructura multinucleada sin límites celulares) limitado en su parte exterior por una membrana plasmática cubierta de una capa de glicocálix que es importante en la difusión de nutrientes hacia el interior del parásito (11,14) y en la evasión de la respuesta inmune del hospedador (15). El tegumento representa la interfaz entre el parásito y su hospedador, y contiene moléculas capaces de estimular el sistema inmune por lo que, actualmente, es considerado una potencial fuente de antígenos para el desarrollo de vacunas (16).

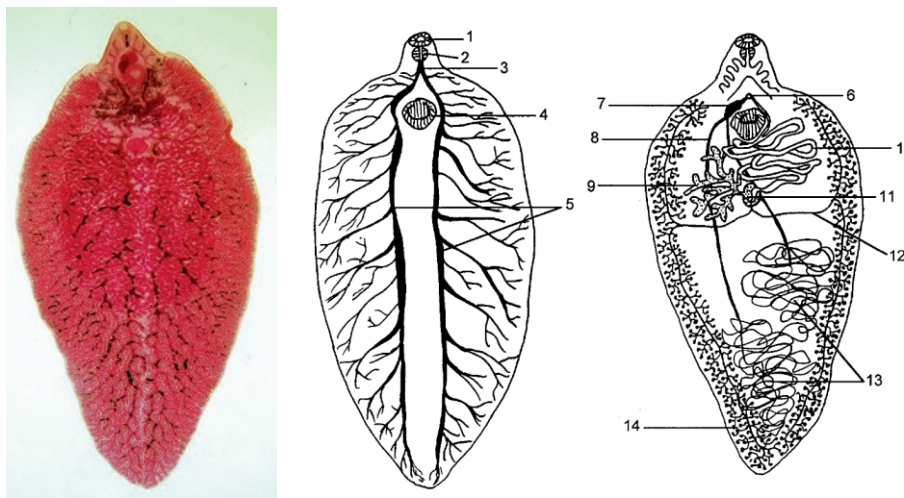


Figura 1. Morfología de los vermes adultos de *Fasciola hepatica*. Verme adulto de *F. hepatica* (izquierda) y representación esquemática de sus principales estructuras internas (centro y derecha). 1: ventosa oral; 2: faringe; 3: esófago; 4: ventosa ventral; 5: ciegos; 6: poro genital; 7: cirro; 8: vaso deferente; 9: ovario; 10: útero; 11: ootipo; 12: conducto vitelino; 13: testículos; 14: glándula vitelina (5,13).

El ciclo biológico de *F. hepatica*, igual que el del resto de trematodos digeneos, incluye dos hospedadores: un hospedador intermediario (HI) invertebrado y un hospedador definitivo (HD) vertebrado (Figura 2). En el caso de *F. hepatica*, los HI son principalmente caracoles de agua dulce de la familia *Lymnaeidae* (grupo *Galba/Fossaria*), mientras que el HD suele identificarse con mamíferos herbívoros comúnmente criados como ganado, principalmente bovinos, ovinos y caprinos,

pudiendo el ser humano también verse afectado (5). En el HD, los vermes adultos se reproducen sexualmente y producen huevos que se eliminan a través de las heces. Si las condiciones ambientales de humedad y temperatura requeridas se cumplen, los huevos eclosionan en el medio acuático y emiten una larva primitiva llamada miracidio, que penetra en el caracol (HI). Dentro de este, el miracidio se divide asexualmente y produce múltiples cercarias que son liberadas al agua y se enquistan generalmente en la superficie de plantas acuáticas formando las metacercarias, que son las formas infectivas para el HD. Una vez ingerida por el HD, la pared de la metacercaria es digerida y los juveniles recién excistados de *F. hepatica* (FhNEJ) son liberados en el duodeno. A continuación, las fases juveniles de *F. hepatica* emprenden un complejo proceso de migración intra-orgánica a través de la pared intestinal, el peritoneo y el tejido hepático hasta llegar a su localización definitiva en las vías mayores del tracto biliar. Los vermes juveniles tardan 6 días en llegar al hígado, y migran durante 5-6 semanas por el hígado hasta llegar a los conductos biliares (5). Los vermes juveniles se alimentan de los tejidos que van atravesando durante su proceso migratorio mientras que, una vez alcanzado el estadio adulto, *F. hepatica* es considerado como un parásito hematófago obligado (17). En los conductos biliares los vermes adultos se desarrollan, empieza la oviposición y se repite el ciclo, que tarda en total entre 14 y 23 semanas en completarse (5,11). Si no son tratados, los vermes adultos pueden sobrevivir en el organismo humano entre 9 y 13 años (5,18).

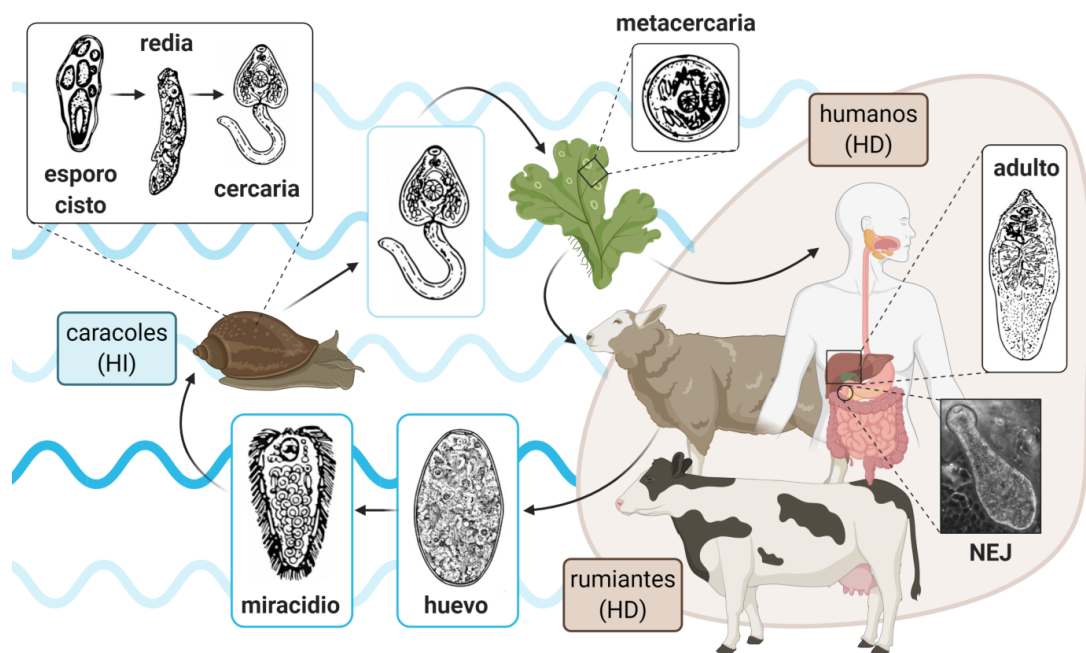


Figura 2. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*. Los huevos liberados con las heces de los hospedadores definitivos (HD) infectados eclosionan en el agua y dan lugar al miracidio, que se introduce principalmente en caracoles de la familia *Lymnaeidae* (grupo *Galba/Fossaria*) (hospedador intermediario, HI). Dentro de estos se desarrolla el esporocisto, las redias y finalmente se generan múltiples cercarias que son emitidas al agua. Las cercarias se enquistan en forma de metacercarias y permanecen generalmente adheridas a plantas acuáticas. Cuando estas plantas son consumidas por el HD (principalmente rumiantes y también el ser humano), las metacercarias son introducidas en el organismo y excistan en el duodeno, liberando los juveniles recién excistados (FhNEJ). Estos llevan a cabo un proceso migratorio complejo hasta llegar a los conductos biliares intra-hepáticos, donde se desarrollan los vermes adultos, empieza la oviposición y se repite el ciclo. *Fotografía de los FhNEJ por cortesía de J. González-Miguel. Representaciones esquemáticas del CDC (19).*

1.2. Epidemiología de la fasciolosis

Además de la variante animal de la fasciolosis, *F. hepatica* infecta también a humanos completando su desarrollo hasta vermes adultos sexualmente activos y alcanzando altas prevalencias en zonas endémicas (5). Actualmente, por tanto, la fasciolosis humana es también un problema de salud pública y está considerada como una enfermedad zoonótica desatendida de prioridad por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (4). La fasciolosis ha tenido un gran interés en el ámbito veterinario debido a las enormes pérdidas económicas que produce en el ámbito ganadero. Sin embargo, el incremento en el número de casos humanos reportados desde 1990 ha hecho que la fasciolosis humana causada por *F. hepatica* haya pasado a considerarse una enfermedad re-emergente en países distribuidos por todo el mundo (20). Gracias a la capacidad de colonización de nuevos ambientes por parte de los caracoles que actúan como hospedadores intermediarios, así como a la habilidad de adaptación a nuevos hospedadores definitivos de los vermes adultos (12), la fasciolosis humana causada por *F. hepatica* muestra una distribución geográfica muy amplia, con casos reportados en 51 países de los cinco continentes, convirtiéndose así en la trematodiasis alimentaria con mayor distribución latitudinal, longitudinal y altitudinal (5).

Las estimaciones vigentes establecen una prevalencia global de fasciolosis humana de entre 2.4 y 17 millones de personas infectadas (5), aunque los números podrían ser mucho mayores debido a un bajo índice de registro de casos en países de bajos recursos y a la posibilidad de que exista un número razonable de casos asintomáticos que aún no han desarrollado los signos asociados a la fase crónica de la patología (18). De hecho, en las zonas con mayor prevalencia de fasciolosis humana las personas afectadas por la enfermedad suelen vivir en condiciones de escaso saneamiento del agua y ausencia de letrinas, con lo cual se practica la defecación al aire libre (20), condiciones que facilitan la transmisión de este parásito. *F. hepatica* representa un problema de salud pública en países de los Andes, Cuba, Irán, Egipto y el Este de Europa (11). En Estados Unidos, los casos registrados se atribuyen mayoritariamente a casos importados (21) y, en Europa, Francia es el país donde un mayor número de casos han sido registrados (5). A pesar de ser considerada una enfermedad zoonótica, la prevalencia de fasciolosis humana no siempre correlaciona directamente con la prevalencia registrada en animales domésticos (5,20), lo que podría deberse a que una vez la enfermedad se ha establecido en humanos, la presencia de reservorios animales que mantengan la transmisión del parásito se vuelve dispensable.

1.3. Patología y clínica de la fasciolosis

La fasciolosis humana se puede dividir en cuatro fases clínicas: el periodo de incubación, que dura desde pocos días a 3 meses; el periodo invasivo o fase aguda, que dura de 2 a 4 meses; el periodo de latencia, que puede durar varios años; y la fase obstructiva o crónica, que puede extenderse hasta alrededor de 13 años (equivalente a la esperanza de vida de los vermes adultos en el organismo humano) si la enfermedad no se trata debidamente (5).

El **periodo de incubación** comienza con la ingesta de las metacercarias y termina cuando aparecen los primeros síntomas. A partir de aquí comienza la **fase aguda**, que es causada por la destrucción mecánica de la pared intestinal, el peritoneo y el parénquima hepático durante la migración de las fases juveniles del parásito. En esta fase aparecen reacciones alérgicas a los antígenos del parásito, fiebre y síntomas abdominales diversos: dolor, flatulencias, pérdida del apetito, náuseas y diarrea; así como alteraciones respiratorias: tos y disnea, principalmente. Una vez los parásitos han alcanzado su localización definitiva en los canales biliares intra-hepáticos, empieza la **fase de latencia**, coincidiendo con su maduración y con el inicio de la emisión de huevos por parte de los vermes adultos. A continuación, la **fase crónica** u obstructiva se caracteriza por una respuesta inflamatoria donde se produce hiperplasia epitelial y dilatación de los conductos y vesícula biliares. Esta colangitis y colecistitis, sumadas al tamaño de los vermes adultos, puede causar importantes obstrucciones en el sistema biliar que pueden cursar acompañadas de dolor epigástrico, náuseas, ictericia, prurito y problemas en la digestión de grasas, entre otros (5,18). Además, la fasciolosis humana puede presentar en ocasiones síntomas neurológicos (hemiplejía, desórdenes en el habla, pérdida de los sentidos, epilepsia y coma, entre otros). Se ha propuesto que estos mecanismos patológicos podrían estar relacionados con la acción de productos excretados/secretados por los vermes adultos de *F. hepatica* que alcanzan el sistema nervioso central. Estos productos antigénicos podrían generar un aumento de la permeabilidad vascular cerebral mediante mecanismos que son dependientes de la activación del sistema fibrinolítico del hospedador (9).

En general, los pacientes con fasciolosis presentan una clínica compleja y heterogénea, y se han descrito también casos en los que se encuentran vermes en localizaciones diferentes al hígado, lo que se conoce como fasciolosis ectópica, mayoritariamente causada por parásitos inmaduros que se desvían de su ruta migratoria habitual y terminan localizados en otros órganos. En humanos, la localización ectópica más común es el tracto gastrointestinal, pero también se han encontrado vermes en el páncreas, bazo, tejido subcutáneo, espacio intracraneal o en la región ocular, entre otras. Finalmente, los mecanismos patológicos causados por *F. hepatica* y *F. gigantica* son clínicamente indistinguibles, aunque cuando el agente causal es *F. gigantica* la probabilidad de obstrucción biliar aumenta debido a un mayor tamaño de los vermes adultos (18).

1.4. Diagnóstico de la fasciolosis

Los signos clínicos más característicos que permiten el diagnóstico de la fasciolosis son eosinofilia y una historia de ingesta de plantas acuáticas, aunque en zonas endémicas estos signos son poco específicos debido a la presencia de otros parásitos que cursan con cuadros clínicos similares (5). El diagnóstico de la fasciolosis puede realizarse mediante técnicas directas, indirectas y/o moleculares.

Las **técnicas de diagnóstico directas** suelen consistir en la observación de huevos en heces o directamente de los parásitos adultos. La técnica de elección recomendada por la OMS es el *Kato-Katz* (22), debido a su bajo precio y fácil uso, lo que la hace muy apropiada para ser utilizada en zonas endémicas donde el desarrollo técnico suele ser limitado. Las técnicas de observación directa de huevos tienen algunas desventajas: son poco específicas a la hora de distinguir entre las dos

especies causantes de fasciolosis debido a la variabilidad en el tamaño que presentan los huevos de *Fasciola* spp. (23); tienen una sensibilidad limitada ya que la cantidad de huevos emitidos no es regular en el tiempo; y si bien permiten determinar cuál es la intensidad de la infección (mediante el cálculo del número de huevos por gramo de heces), en la fasciolosis existe una baja correlación entre el número de huevos por gramo de heces y la cantidad de vermes adultos presentes en el hospedador (5). Además, estas técnicas solo detectan la enfermedad una vez ya se han desarrollado los vermes adultos que producen huevos, de modo que no permiten evitar la transmisión del parásito entre la población del individuo afectado. Por otro lado, las técnicas de observación directa de los vermes adultos son muy invasivas y raramente utilizadas (5).

Las **técnicas de diagnóstico indirectas** se basan en la inmuno-detección en muestras de suero o sangre de anticuerpos generados por el hospedador en respuesta a la infección. Existen múltiples test de tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) basados en la detección de antígenos de *Fasciola* spp. altamente sensibles y específicos, incluso cuando la proteínas se producen de forma recombinante (5) y algunos de ellos están disponibles a nivel comercial (*Fasciola* IgG ELISA, DRG Instruments GmbH, Germany). También existe un test inmuno-cromatográfico o de flujo lateral llamado *SeroFluke*TM (24) que resulta muy apropiado para el diagnóstico en zonas endémicas ya que presenta requisitos técnicos muy básicos.

Finalmente, las **técnicas de diagnóstico molecular**, basadas en la detección de ácidos nucleicos especie-específicos, son las que permiten obtener un diagnóstico diferencial exacto entre los dos agentes etiológicos de la fasciolosis. Estas técnicas se basan mayoritariamente en la amplificación de los genes ITS1 e ITS2 del RNA ribosómico y son altamente sensibles y específicas pero incapaces de detectar híbridos (5). Estas técnicas requieren equipos complejos, lo que ha sido parcialmente solventado mediante el desarrollo de un ensayo LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*), basado en la amplificación de ácidos nucleicos a una temperatura constante (25). Las técnicas de diagnóstico molecular de fasciolosis existentes son cualitativas y no dan información sobre la intensidad de la infección.

1.5. Tratamiento y control de la fasciolosis

Fasciola spp. es un caso peculiar dentro de los trematodos, ya que está generalmente aceptado que sea el único género que no responde al tratamiento con praziquantel dentro de este grupo de parásitos (5). El tratamiento de elección para la fasciolosis recomendado por la OMS es el **triclabendazol** (TCBZ) a dosis única de 10 mg/kg (22). El TCBZ es un benzimidazol activo frente a todos los estadios de desarrollo de *Fasciola* spp. (22,26) y al igual que otros benzimidazoles podría actuar uniéndose a la tubulina e inhibiendo su polimerización (26). A pesar de ser un fármaco muy eficaz, en los últimos años los casos de resistencia a TCBZ han aumentado debido a su uso masivo en animales de ganadería (6). Los mecanismos de resistencia al TCBZ no se conocen en profundidad (5) pero podrían deberse a una reducción en su internalización o un mayor eflujo y metabolismo del fármaco (6,26). La combinación de fármacos ha sido utilizada con éxito en diversas ocasiones para tratar casos resistentes a TCBZ (5,26), y la nitazoxanida también ha mostrado buenos resultados en

fasciolosis humana resistente a TCBZ (5), aunque ya se ha reportado un caso de fasciolosis humana resistente a TCBZ e insensible a nitazoxanida (27).

Frente a esta incipiente **emergencia de resistencias** a los tratamientos disponibles para la fasciolosis, las medidas de control y prevención se convierten en esenciales para el manejo de esta enfermedad. En zonas hiper-endémicas de Bolivia y Perú se llevan a cabo programas de tratamiento masivo con TCBZ de forma anual, pero también una inspección rigurosa de las plantas acuáticas comestibles, filtración del agua antes de su consumo y estrategias de control vectorial que reduzcan la población de caracoles son otras medidas de control propuestas en zonas endémicas (5). Sin embargo, la gran variabilidad de patrones epidemiológicos que presenta la fasciolosis humana, que hace que las medidas de control sean útiles en algunas regiones pero no en otras, así como la aparición de resistencias a TCBZ y los potenciales efectos deletéreos para el medio ambiente de algunas de las medidas de control propuestas, incrementan la necesidad del desarrollo de una vacuna efectiva contra esta enfermedad.

El primer intento de vacuna contra la fasciolosis data de 1975 (28) y, desde entonces, se han intentado múltiples estrategias tanto en modelos de laboratorio (ratones, ratas, conejos) como en animales de ganadería (bovinos, ovinos, caprinos) con resultados muy variables (29). Los antígenos más comúnmente utilizados como vacunas contra *F. hepatica* han sido proteínas del verme adulto del parásito. Estos están muy conservados entre las diferentes variedades genéticas de *F. hepatica*, de modo que la variabilidad en la respuesta protectora de dichas vacunas no se debe a diferencias genéticas entre parásitos geográficamente distantes, sino a variaciones entre los hospedadores o en la eficiencia de los adyuvantes utilizados (29,30). No obstante, la complejidad antigénica de la fase adulta del parásito, la cual incluye sistemas redundantes de isoformas que facilitan la evasión de la respuesta inmune, así como su localización anatómica en el hospedador, en un lugar de difícil acceso para sus mecanismos defensivos, podrían ser también responsables de la baja efectividad de estos ensayos vacunales.

Recientemente, la importancia de las fases juveniles de *F. hepatica* ha sido reconocida a la hora de formular candidatos vacunales gracias a su localización en el HD, que facilita una mayor exposición al sistema inmune, y con el objetivo de controlar la infección antes de que se desarrolle la fase aguda de la misma (31). Además, dirigir el desarrollo de vacunas hacia las fases juveniles de *F. hepatica* podría evitar su desarrollo hasta vermes adultos y, por lo tanto, bloquear la transmisión de la enfermedad entre la población del individuo afectado. Sin embargo, los estudios de vacunación con antígenos de vermes juveniles solo se han llevado a cabo en animales de experimentación (ratas) y en ningún caso en los reservorios naturales del parásito (rumiantes) (Tabla 1). En dichos ensayos vacunales, el uso de antígenos nativos ha proporcionado mayor eficacia en comparación con aquellos realizados con antígenos recombinantes, lo que sugiere que modificaciones postraduccionales como la glicosilación pueden ser importantes en el desarrollo de una respuesta inmune efectiva contra el parásito por parte del hospedador (29).

Tabla 1. Ensayos vacunales realizados hasta el momento actual con antígenos de las fases juveniles de *Fasciola hepatica*.

Antígeno	Hospedador	Origen	Eficacia	Adyuvante	Ruta	Ref.
Extracto Crudo	Ratas	FhNEJ	92.6% (CP)	-	Intraperitoneal	(32)
proFhCL3	Ratas	Recombinante	52% (CP)	Carbopol	Intramuscular	(33)
FhCL1g, FhCL5, FhCB (combinaciones)	Ratas	Recombinante	Máximo 83% (combinación FhCB/FhCL5) (CP)	Quil A	Intraperitoneal	(34)
FhCL3-1	Ratas	Recombinante	47% (CP)	Imject Alum	Subcutánea	(31)
FhCL3-2	Ratas	Recombinante	63% (CP)	Imject Alum	Subcutánea	
FhCL3-1, FhCL3-3 y FhCB3	Ratas (hembras)	Recombinante	No reducción	Imject Alum	Subcutánea	(35)

CP: carga parasitaria en porcentaje, basada en el conteo de vermes adultos durante la necropsia. Para la elaboración de esta tabla se realizó una búsqueda en *PubMed* mediante los términos “*fasciola hepatica vaccine*” que ofreció 302 resultados. Después de eliminar los artículos irrelevantes, se seleccionaron 109 artículos en los que se realizaban ensayos de vacunación con antígenos de *Fasciola hepatica*. De estos, solo los 6 artículos incluidos en esta tabla realizaban ensayos de vacunación con antígenos de parásitos juveniles, lo que evidencia que el desarrollo de vacunas contra *F. hepatica* se ha centrado principalmente en el uso de antígenos de vermes adultos. Estudios anteriores al de van Milligen et al. (32), en el que se realizaron ensayos de vacunación con antígenos de vermes juveniles (36–38) no se han incluido en esta tabla por no poder determinar el origen exacto de los vermes juveniles cuyos antígenos se utilizan como vacuna (36,37) o porque consideran juveniles a vermes pre-adultos del tejido hepático (38).

Ante este escenario, resultaría de gran importancia aumentar el conocimiento sobre los mecanismos de interacción entre el hospedador vertebrado y las fases juveniles de *F. hepatica*, con el objetivo de identificar moléculas clave para la supervivencia de estas y que, potencialmente, puedan servir como candidatos vacunales eficaces antes de que el parásito alcance su localización definitiva.

1.6. Relación FhNEJ/hospedador: el punto de “no retorno” de la fasciolosis

A pesar de que la **migración** es un proceso muy costoso en términos energéticos, muchos parásitos helmintos la incluyen en su ciclo biológico, lo que sugiere que este mecanismo confiere algún tipo de ventaja evolutiva. En relación a esto, se considera que los procesos de migración parasitaria surgieron como consecuencia de la evolución de los mecanismos defensivos a nivel de las mucosas respiratoria y gastrointestinal del hospedador. De hecho, los parásitos helmintos que incluyen la migración en sus fases inmaduras presentan un mayor tamaño y un tiempo de maduración menor en comparación con parásitos que no migran (7).

A diferencia de otros trematodos hepáticos, que llegan al hígado directamente a través del canal biliar principal desde el intestino delgado, los vermes juveniles de *F. hepatica* alcanzan el tejido hepático a través de una ruta migratoria compleja que empieza en la cavidad abdominal. Las metacercarias excistan en el intestino delgado una hora después de haber sido ingeridas y los FhNEJ penetran la pared intestinal y aparecen en la cavidad abdominal en torno a dos horas después de la ingestión (5). Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares responsables de estos procesos

migratorios, diferentes tipos de proteasas parecen estar relacionadas con el atravesamiento parasitario de tejidos. Entre ellas, la familia de las catepsinas es un grupo de endopeptidasas de cisteína ampliamente expresadas en las secreciones de *F. hepatica* (39). Además de su participación en procesos de migración e invasión parasitaria, el papel de las catepsinas en mecanismos de inmuno-modulación ha justificado su empleo en un gran número de ensayos vacunales frente a *F. hepatica*, que no siempre han obtenido resultados esperanzadores (40). No obstante, existe una expresión diferencial de las numerosas isoformas de la familia a lo largo del ciclo biológico del parásito que correlaciona directamente con su paso a través de los tejidos (41) y que dificultaría, en gran medida, la eficacia de una vacuna frente a este tipo de antígenos. Así, los FhNEJ expresan principalmente catepsinas de los isotipos B1, B2 y B3 (FhCB1/2/3), y L3 (FhCL3), esta última muy importante en la migración tisular debido a su capacidad de degradar colágeno, mientras que los vermes adultos expresan principalmente FhCL1/2/5. Estas catepsinas tienen una menor actividad colagenolítica, pero son capaces de digerir proteínas sanguíneas, importantes para la nutrición de los vermes adultos (17). Además, FhCL1 y FhCL2 son capaces de degradar diferentes isotipos de anticuerpos humanos (42) y FhCL1 también degrada el receptor TLR3 presente en la superficie de los macrófagos (43), lo que es importante en la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Figura 3). Hasta la fecha no se ha descrito ninguna actividad proteolítica en FhNEJ que permita evadir el sistema inmune del hospedador mediante una estrategia similar a lo que sucede en adultos.

A parte de mecanismos proteolíticos endógenos, los parásitos también aprovechan el sistema fibrinolítico de sus hospedadores, concretamente la actividad de la proteasa de amplio espectro plasmina, para llevar a cabo procesos de migración y evasión del sistema inmune (8) (Sección 3). Concretamente, en el caso de *F. hepatica* se han descrito múltiples proteínas excretadas capaces de interactuar con el sistema fibrinolítico del hospedador (9,10), y estudios *in vitro* demuestran que la catepsina L es capaz de degradar el fibrinógeno y la fibrina (44), principal sustrato de la plasmina. Sin embargo, estos estudios han sido realizados con extractos de vermes adultos, de modo que no se conoce si los vermes juveniles del parásito podrían valerse de estrategias similares basadas en la explotación de funciones biológicas del hospedador, como por ejemplo la fibrinólisis, para llevar a cabo su proceso de migración.

Por otro lado, la migración de los FhNEJ no sería posible sin mecanismos para la **evasión de la respuesta inmune** del hospedador. Poco después de excitar, los FhNEJ segregan diversas moléculas inmuno-moduladoras que regulan la respuesta inmune humoral y celular del hospedador. Estas moléculas favorecen la proliferación de linfocitos T reguladores y la polarización de la respuesta inmune hacia un fenotipo Th₂, ambos hechos implicados en crear un ambiente anti-inflamatorio (45,46). La polarización hacia una respuesta de tipo Th₂ inducida por *F. hepatica* es tan potente que los hospedadores infectados raramente desarrollan respuestas inflamatorias de tipo Th₁ frente a infecciones concomitantes por parte de bacterias y otros patógenos (7). Además, los FhNEJ expresan diversas proteínas anti-oxidantes (incluyendo la superóxido dismutasa) que les protegen de las especies reactivas de oxígeno generadas por eosinófilos y macrófagos (47).

Finalmente, otro de los mecanismos utilizados por los vermes juveniles para evadir el sistema inmune es el recambio de la capa externa de glicocálix que los recubre, lo que les permite desprenderse de los anticuerpos que se unen a ella y evitar la activación del complemento y de células del sistema inmune (15) (Figura 3).

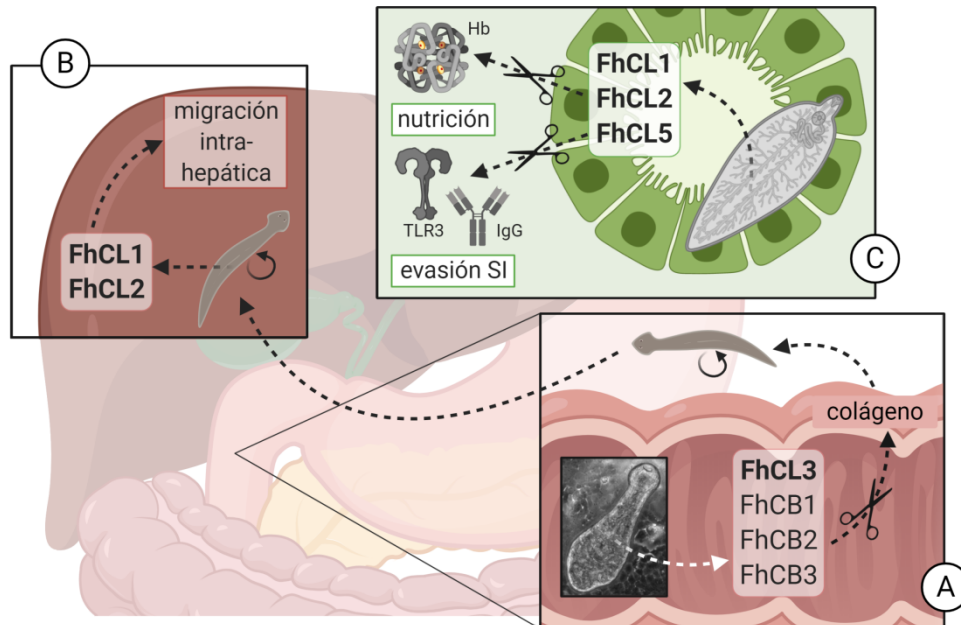


Figura 3. Relación entre *Fasciola hepatica* y su hospedador. *F. hepatica* expresa diferentes proteasas de la familia de las catepsinas a lo largo de su desarrollo. **A:** En el duodeno, los juveniles de *F. hepatica* recién excistados (FhNEJ) expresan principalmente FhCB1/2/3 y FhCL3, esta última con gran capacidad colagenolítica, lo que permite a los vermes juveniles atravesar la pared intestinal y la cápsula de *Glisson* que recubre el hígado. **B:** Una vez en el hígado, los vermes inmaduros expresan FhCL1 y FhCL2, importantes en la migración intra-hepática. El recambio de la capa externa de glicocálix de los FhNEJ y los vermes inmaduros representa otra estrategia de evasión del sistema inmune del hospedador durante la migración hacia el hígado (**A,B**). Dentro de los canales biliares intra-hepáticos, los vermes adultos (**C**) expresan FhCL1, FhCL2 y FhCL5, capaces de degradar la hemoglobina (Hb), su principal fuente de alimento, y diferentes isotipos de IgG, así como el TLR expresado por macrófagos, lo que es importante para la evasión del sistema inmune del hospedador. *Fotografía de los FhNEJ por cortesía de J. González-Miguel.*

OBJETIVO 2: EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO DE LOS HOSPEDADORES VERTEBRADOS

2.1. El sistema fibrinolítico como parte del sistema hemostático

El sistema fibrinolítico forma parte del sistema hemostático de los vertebrados, el cual emplea una gran variedad de moléculas y receptores vasculares y extravasculares que actúan en conjunción con diferentes componentes celulares con el fin de reparar las lesiones que aparecen en las paredes de los vasos sanguíneos (48).

El sistema hemostático está dividido en tres fases: agregación plaquetaria, coagulación y fibrinólisis; también conocidas como hemostasis primaria, secundaria y terciaria, respectivamente (49,50). Brevemente, la **agregación plaquetaria** tiene como finalidad la formación de un tapón hemostático producido gracias a la activación de las plaquetas que circulan por el vaso sanguíneo. Dicha activación es llevada a cabo a través de señales de la matriz extracelular expuesta cuando se produce una disrupción de la continuidad del endotelio. Ante esta situación, las plaquetas se unen en primer lugar al colágeno, que es la proteína más abundante de la matriz extracelular (51), y se desencadena una vía de señalización que finalmente resulta en la unión de fibrinógeno, lo que permite la interacción entre las plaquetas y su agregación alrededor de la lesión. Este proceso está regulado por señales emitidas por las células endoteliales con el fin de restringir la agregación plaquetaria a las zonas próximas a la lesión (49,50).

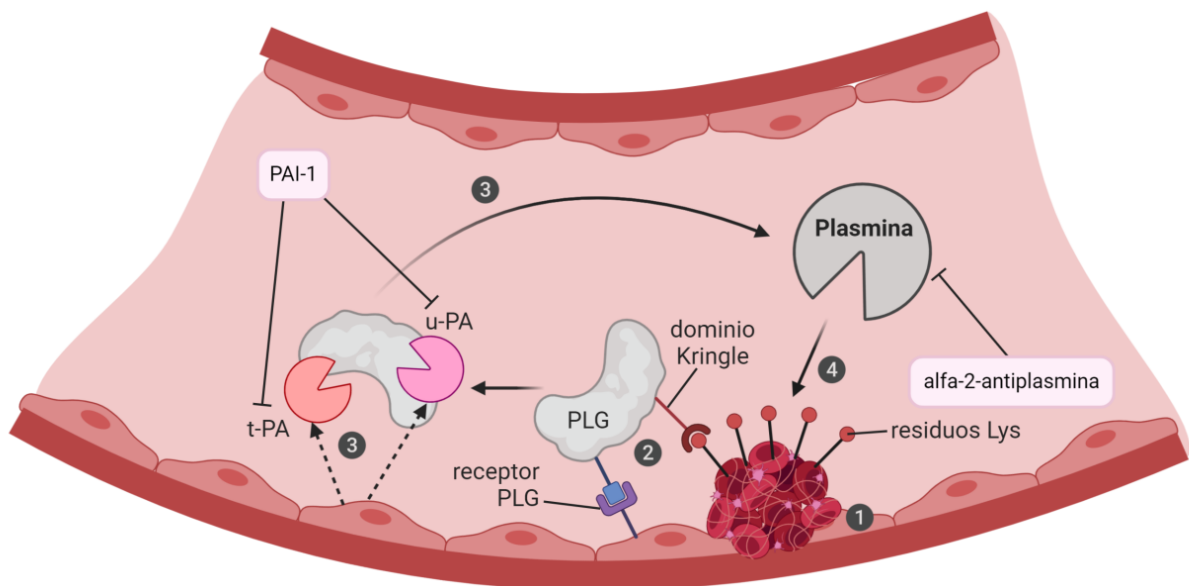


Figura 4. Visión general de la fibrinólisis. [1] Cuando se produce una lesión endotelial, la cascada de coagulación culmina en la formación de un coágulo cubierto de fibrina que sella la zona dañada y evita hemorragias. **[2]** El plasminógeno (PLG) es una pro-enzima que se une a la superficie del coágulo directamente a través de la interacción de sus dominios *Kringle* con aminoácidos de lisina de la fibrina y también mediante la unión a receptores celulares presentes en diferentes tipos celulares. **[3]** Las células endoteliales segregan activadores del PLG [el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA)], que son proteasas que tienen actividad sobre el PLG anclado al coágulo de modo que escinden una parte de este y lo convierten en su versión catalíticamente activa, la plasmina. **[4]** La plasmina es una proteasa de serina que degrada la fibrina (insoluble) en productos de degradación solubles, facilitando la disolución del coágulo. Los principales inhibidores del sistema fibrinolítico son la alfa-2-antiplasmina (a2-AP) y el inhibidor de los activadores del plasminógeno 1 (PAI-1).

La segunda fase del sistema hemostático, la **cascada de coagulación**, culmina en la activación de la trombina, que rompe el fibrinógeno para producir fibrina. La fibrina es una proteína insoluble y forma una red que se deposita sobre el tapón plaquetario con el fin de fortalecerlo y estabilizarlo, formándose así el coágulo (50). Finalmente, una vez la lesión del vaso se ha reparado, el coágulo se elimina mediante la **fibrinólisis** o activación del sistema fibrinolítico, que culmina en la activación de la plasmina, una enzima que digiere la fibrina y permite que el coágulo se disuelva (49,50) (Figura 4).

Desórdenes en el sistema fibrinolítico pueden deberse a una activación excesiva, lo que resulta en un exceso de sangrado, o al contrario, a una activación deficiente, causando así problemas de trombosis (52) debido a que los coágulos no resueltos terminan por desprenderse de la pared del vaso y taponan vasos de menor calibre.

2.2. Funciones y componentes principales del sistema fibrinolítico

2.2.1. El plasminógeno

El plasminógeno (PLG) es una glicoproteína de cadena única de 92 kDa y 791 aminoácidos sintetizada principalmente en el hígado y que se encuentra en el plasma a una concentración de entre 1.5 y 2 μM . Esta pro-enzima tiene 24 puentes disulfuro y está dividida en siete dominios estructurales (53): el dominio *pan-apple* o de pre-activación (PAP), cinco dominios de tipo triple *loop* que se conocen como dominios *Kringle* y el dominio catalítico formado por la tríada His630, Asp646 y Ser741 (Figura 5).

Al tratarse de un zimógeno, la conversión de PLG a plasmina depende de la escisión por parte de alguno de sus activadores [el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA)] del enlace peptídico que une a los aminoácidos Arg560 y Val561 (52,54,55), que forman el llamado *loop* de activación (56). Esta escisión libera las dos cadenas de la plasmina generada (una cadena pesada que incluye los dominios *Kringle* y una cadena ligera que contiene el sitio activo) unidas por dos puentes disulfuro (52,54,55).

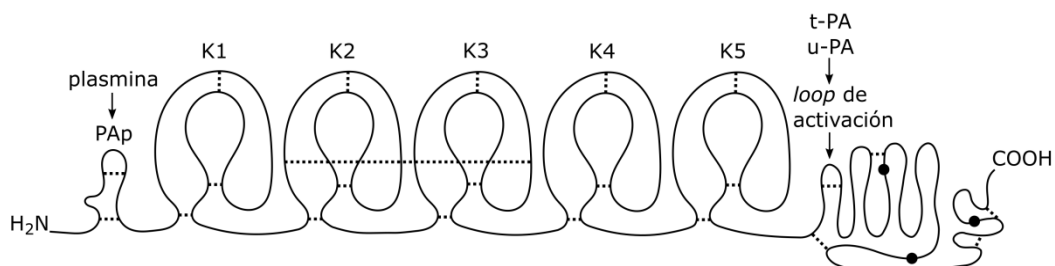


Figura 5. Estructura del plasminógeno. El plasminógeno (PLG) está formado por cinco dominios *Kringle*, el dominio PAP, que es escindido por la plasmina, el dominio de activación (*activation loop*), que es escindido por los activadores t-PA y u-PA para activar el PLG y generar plasmina, y el dominio catalítico, formado por los tres aminoácidos que forman el sitio activo de la plasmina (puntos cercanos al extremo carboxiterminal). Las líneas discontinuas indican puentes disulfuro.

Los dominios *Kringle* juegan un papel muy importante en las funciones biológicas del PLG, ya que contienen sitios de unión a lisina que median la interacción del PLG con la fibrina, receptores

celulares y otras proteínas ricas en dicho aminoácido (55); así como de la plasmina con su inhibidor alfa-2-antiplasmina (α 2-AP) (52,54,57). Aunque los dominios *Kringle* son homólogos, presentan diferentes afinidades a lisina, siendo K1 el que tiene mayor afinidad seguido de K4 y K5 (53,58).

El PLG es en realidad sintetizado por los hepatocitos como una proteína de 810 aminoácidos que contiene un ácido glutámico en su parte N-terminal, por lo que se le denomina Glu-PLG. La plasmina es capaz de cortar el enlace peptídico que hay entre los aminoácidos Lys62, Arg68 y Lys77, que forman el dominio PAp (59), dando lugar así a una forma de PLG que tiene lisina, valina o metionina en su extremo N-terminal, formas que genéricamente se conocen como Lys-PLG (52,54,59). El Lys-PLG no se encuentra circulando en el plasma, sino unido a superficies (55) y tiene una conformación más abierta que el Glu-PLG, de modo que los activadores t-PA y u-PA presentan mayor actividad sobre el Lys-PLG que sobre el Glu-PLG por estar el *loop* de activación del primero más expuesto (52,55,59). Asimismo, los activadores tienen más actividad sobre el Glu-PLG unido a superficies que por su forma soluble en sangre. Según estas características, el modelo propuesto de activación del PLG está resumido en la Figura 6.

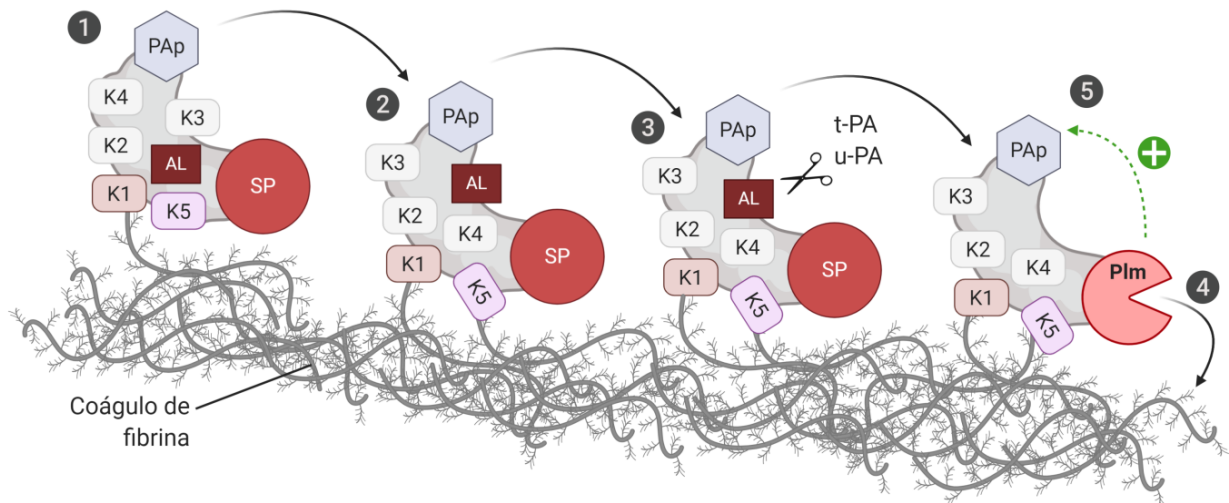


Figura 6. Activación del plasminógeno. [1] En presencia de fibrina, el plasminógeno (PLG) se une a residuos de Lys presentes en esta mediante el dominio *Kringle* 1 (K1). [2] Esta unión genera un pequeño cambio conformacional que abre parcialmente la molécula de PLG y permite que el dominio *Kringle* 5 (K5) se una a la fibrina y a la vez exponga el *loop* de activación (*activation loop*, AL), haciéndolo accesible a los activadores t-PA y u-PA. [3] t-PA y u-PA escinden el dominio de activación y se genera plasmina (Plm). [4] La plasmina degrada la fibrina, facilitando la disolución del coágulo y, a su vez, [5] es capaz de escindir el dominio de pre-activación o dominio *pan-apple* (PAp) de las moléculas de PLG que van llegando al coágulo, haciendo que adopten una conformación abierta que es activada a plasmina por los activadores t-PA y u-PA con más rapidez. Esto representa un mecanismo de retroalimentación positiva que acelera la cascada fibrinolítica. En ausencia de fibrina, el PLG circulante tiene una conformación cerrada en la que el dominio de activación no está expuesto y por lo tanto no se genera plasmina.

2.2.2. Receptores del plasminógeno

Los receptores del PLG (PLG-R) juegan un papel central en el sistema fibrinolítico y en otras funciones biológicas del sistema PLG/plasmina ya que los activadores t-PA y u-PA son más eficientes sobre el PLG unido a membranas que en solución (52,53,59). Además, la plasmina generada después de la activación permanece unida a estos receptores, hecho por el cual quedaría protegida

de la acción de su inhibidor α_2 -AP, ya que tanto la unión a los receptores como al inhibidor se dan mediante los mismos dominios *Kringle* (53,60).

Los PLG-R son muy variados y están presentes tanto en células eucariotas como en procariotas. Su importancia reside en que ayudan a co-localizar el PLG, sus activadores y la plasmina resultante, de modo que la actividad catalítica se concentra alrededor de la superficie celular en sitios muy concretos (53,61). En ocasiones, esta co-localización se debe a que los receptores tanto del PLG como de sus activadores son comunes, como es el caso de Plg-R_{KT}, capaz de unir PLG y t-PA (60). El mecanismo de acción de este tipo de receptores está generalmente mediado por la presencia de aminoácidos de lisina en sus extremos carboxiterminales que tienen capacidad para unirse a los dominios *Kringle* del PLG (53,59). La importancia de este mecanismo se evidencia en la dramática reducción en la generación de plasmina observada en estudios realizados en células pre-tratadas con carboxipeptidasa B, una enzima capaz de escindir lisinas carboxiterminales, y en experimentos que incluyen una pre-incubación del PLG con ácido amino-caproico (ϵ -ACA), un análogo de lisina que compite con los receptores celulares para unirse al PLG (60,62). No obstante, se han descrito también proteínas capaces de unir PLG que no tienen lisina en su extremo carboxiterminal, sino estructuras internas que imitan a residuos de lisina (62,63) e incluso moléculas no proteicas, como gangliósidos (53) y glucosaminoglucanos (64), capaces de unir PLG. Los PLG-R tienen un patrón de expresión muy amplio ya que son expresados por casi todos los tipos celulares, excepto eritrocitos (53), lo que explica el gran número de procesos fisiológicos y patológicos en los que el sistema PLG/plasmina está involucrado (60).

Curiosamente, la mayoría de PLG-R conocidos (incluyendo anexina A2-S100A10, enolasa-1 y H2B) son proteínas citosólicas y nucleares que no se localizan normalmente en las membranas celulares, sino que son transportadas a la superficie celular cuando aparece un estímulo pertinente, como la presencia de fibrina o estímulos inflamatorios (53,62). Receptores que sí tienen un dominio transmembrana y que por lo tanto están constitutivamente presentes en la superficie celular incluyen el Plg-R_{KT} y proteínas de adhesión de la familia de las integrinas, principalmente de la subfamilia β_2 ; estas últimas altamente expresadas en leucocitos (62). Excepto en el caso de anexina A2 (53), los PLG-R que se encuentran en el espacio intracelular aumentan su concentración en la membrana de la célula de forma independiente a un aumento en su síntesis proteica. Además, el uso de inhibidores de los canales de calcio inhibe algunas de las respuestas dependientes de PLG, lo cual sugiere que la presencia de los PLG-R en la membrana, o por lo menos de algunos de ellos, se regula mediante mecanismos dependientes de calcio (62,63).

El hecho de que el sistema PLG/plasmina represente una potente maquinaria proteolítica que interviene en un gran número de procesos biológicos, sugiere que las células hayan evolucionado de manera que se empleen proteínas citosólicas o nucleares como PLG-R, que no están disponibles en la membrana de forma constitutiva, como un mecanismo de seguridad que garantiza que la generación de plasmina ocurra solo en presencia de un estímulo determinado. Además, la concentración de PLG en sangre es notablemente elevada (60), de modo que la presencia de receptores de membrana, aun estando en concentraciones muy pequeñas, podría desencadenar la

generación de plasmina a niveles suficientes como para generar consecuencias indeseadas en ausencia de un estímulo concreto. Los PLG-R que han sido más extensamente descritos son el complejo anexina A2-S100A10(p11), la enolasa-1 (alfa-enolasa), la histona H2B y el Plg-R_{KT}, todos ellos pertenecientes al grupo de PLG-R que tienen lisina en su extremo carboxiterminal (53).

2.2.3. Activadores del plasminógeno

El PLG es convertido en plasmina mediante la acción de sus activadores, el activador tisular del PLG (t-PA) y el activador de PLG de tipo uroquinasa (u-PA). Estas moléculas son, igual que la plasmina, enzimas del tipo proteasas de serina que contienen dominios *Kringle* similares a los presentes en el PLG. La síntesis y/o secreción de estos activadores ocurre solo en presencia de estímulos determinados y permite que exista una regulación espacio-temporal de la generación de plasmina (60). El t-PA está principalmente involucrado en la disolución de los coágulos de fibrina durante la ruta fibrinolítica (55,65), mientras que el u-PA está implicado en la generación de plasmina a nivel pericelular y, por lo tanto, es a través de este activador que el sistema fibrinolítico está involucrado también en procesos que requieren la degradación/remodelación de la matriz extracelular, como ocurre durante el remodelado tisular, la respuesta inflamatoria y la invasión tumoral (52). En cuanto a la fibrinólisis, ratones doble *knock-out* que no expresan ninguno de los activadores muestran fenotipos similares a ratones PLG *knock-out* que no se observan en animales que carecen de solo uno de los activadores (66), de modo que t-PA y u-PA tienen funciones fibrinolíticas redundantes *in vivo*. Ambos activadores se utilizan también en contextos clínicos para tratar diversos desórdenes trombolíticos (65,67).

Activador tisular del plasminógeno (t-PA). El t-PA es una proteasa de serina de 527 aminoácidos que contiene diferentes dominios estructurales, entre ellos dos dominios *Kringle* homólogos a los del PLG (52,54,55) y el dominio catalítico, formado por la tríada His322, Asp371 y Ser478 (52). El t-PA es producido y segregado principalmente por las células endoteliales en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo la trombina, y es el principal responsable de la generación de plasmina a nivel vascular (55,65).

El t-PA presenta una actividad catalítica mucho mayor cuando está unido a superficies que en solución (54,65), y se localiza en la superficie del coágulo interaccionando directamente con la fibrina o bien uniéndose al complejo anexina 2/S100A10 o a Plg-R_{KT}, igual que lo hace el PLG, formándose así un complejo ternario que permite activar la plasmina de forma muy localizada. La unión del t-PA a los receptores sirve también como un mecanismo de auto-protección ante la acción de inhibidores como el inhibidor de los activadores del plasminógeno 1 (PAI-1) (65). La plasmina es capaz de escindir una parte del t-PA generando una forma del activador que tiene el dominio catalítico más expuesto y mayor actividad proteolítica (52,58,65), sugiriendo un mecanismo de retroalimentación positiva que acelera la fibrinólisis de forma similar a lo que ocurre durante la activación del PLG (58,65) (Figura 6).

Activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA). El activador u-PA es una proteasa de serina de 411 aminoácidos (52,55) con diferentes dominios estructurales, entre ellos un dominio

Kringle y un dominio de tríada catalítica en su extremo carboxiterminal (52,55,65). El dominio amino-terminal se une con gran afinidad al receptor de u-PA asociado a glicosilfosfatidilinositol, conocido como u-PAR. La unión del u-PA a su receptor uPAR es crítica para la función del activador en la respuesta inflamatoria (65) (Figura 7) pero parece ser dispensable para su función en la fibrinólisis (66). El dominio *Kringle* interactúa con el inhibidor PAI-1 (65) y no contiene un sitio de unión a lisina, lo que explica que u-PA no se una directamente a fibrina (52). El u-PA de cadena simple (sc-uPA) es escindido por la plasmina (52,55), calicreína (55) u otras proteasas (54) y se transforma en una enzima de doble cadena (dc-uPA) que tiene unas 300 veces más actividad por el PLG que el sc-uPA (65), sugiriendo nuevamente un mecanismo de retroalimentación positiva que acelera la activación del PLG (Figura 6).

El activador u-PA es sintetizado por células endoteliales, macrófagos, neutrófilos, células epiteliales renales y algunas células tumorales (55,68) y es capaz de procesar no solo el PLG, sino también otras moléculas como factores de crecimiento y metaloproteasas (65). De este modo, el u-PA está involucrado en procesos que requieren remodelación de la matriz extracelular, como la migración de células inflamatorias. De hecho, u-PA y u-PAR son proteínas centrales en la **respuesta inflamatoria** ya que 1) estimulan la degradación de la matriz extracelular mediante la generación de plasmina a partir de PLG, favoreciendo la migración de células inflamatorias y 2) activan vías de señalización intracelular (68); siendo ambos hechos fundamentales en procesos de migración celular, quimiotaxis, proliferación y supervivencia de las células inflamatorias (68,69) (Figura 7). Estos mecanismos son también explotados por algunas células malignas para la invasión y el crecimiento tumorales (68,69).

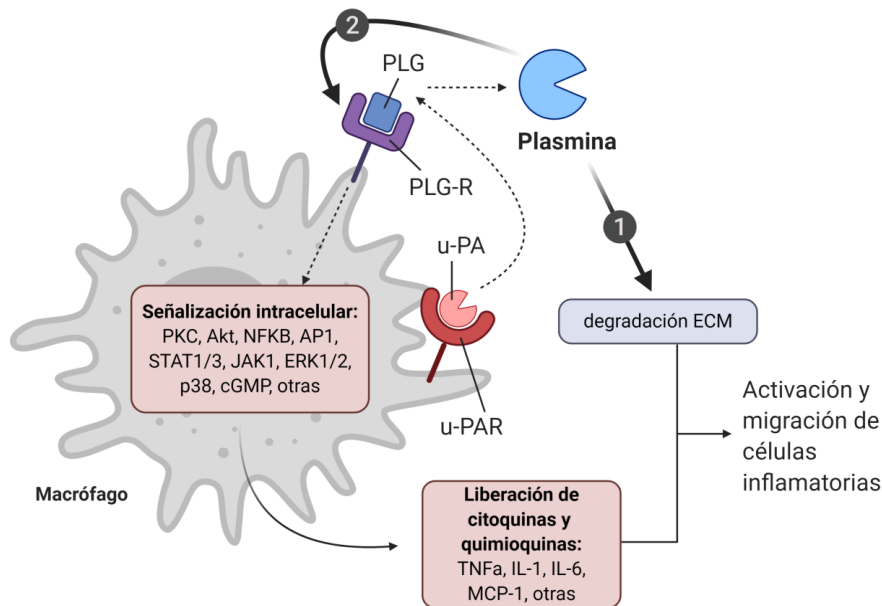


Figura 7. Activación de células presentadoras de antígenos por el sistema plasminógeno/plasmina. La generación de plasmina en el entorno pericelular tiene un rol dual: en primer lugar, proveer a la célula inflamatoria de una maquinaria proteolítica que [1] le permita degradar componentes de la matriz extracelular y migrar en dirección a estímulos quimio-atrayentes y [2] promover la secreción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias, ambos procesos importantes para la activación y migración leucocitarias. La secreción de estos mediadores inflamatorios depende de la actividad catalítica de la plasmina, que es capaz de escindir parte del receptor (anexina 2/S100A10, por ejemplo) donde se había unido el plasminógeno (PLG) generando proteínas truncadas que actúan como moléculas de transducción que activan las vías intracelulares que culminan en la secreción de citoquinas y quimioquinas por parte de la célula inflamatoria. Basado en Syrovets et al. (58).

2.2.4. Inhibidores de la fibrinólisis

La inhibición de la fibrinólisis puede ocurrir a nivel de los activadores t-PA y u-PA o directamente a nivel de la plasmina (54). Los principales inhibidores del sistema PLG/plasmina son la a2-AP, alfa-2-macroglobulina, el inhibidor de fibrinólisis activado por trombina (TAFI), los inhibidores de los activadores de plasminógeno 1, 2 y 3 (PAI-1/2/3), la nexina-1 y la neuroserpina (52,54,55,67).

La a2-AP es el principal inhibidor de la plasmina presente en el plasma, seguido por la alfa-2-macroglobulina, que tiene una eficiencia de inhibición de la plasmina unas 10 veces menor que la anterior (54,55); mientras que el principal inhibidor de t-PA y u-PA es PAI-1 (54,55,67). PAI-2 es importante durante el embarazo (55,67) y PAI-3 en el desarrollo embrionario (70). La neuroserpina, expresada mayoritariamente en el cerebro, y la nexina-1, expresada por múltiples tipos celulares, son inhibidores capaces de actuar sobre los tres componentes principales del sistema fibrinolítico: t-PA, u-PA y plasmina (67). El TAFI es una carboxipeptidasa plasmática y, como tal, escinde residuos de Lys y Arg carboxiterminales como los que se encuentran en la fibrina y que sirven de anclaje al PLG. Al ser activado por la trombina y la trombosmodulina, el TAFI representa un ejemplo de cómo los sistemas de coagulación y fibrinolítico están estrechamente relacionados (52,55).

Muchos de los inhibidores del sistema PLG/plasmina (todos los mencionados anteriormente exceptuando la alfa-2-macroglobulina y el TAFI) forman parte de la superfamilia de las **serpinas** (del inglés *serpins*: *serin-protease inhibitors*) (71). Las serpinas son inhibidores de proteasas altamente conservados y presentes en múltiples organismos, desde virus hasta vertebrados, que inhiben la acción de proteasas de serina mediante lo que se conoce como un “mecanismo de suicidio” (67,71): en primer lugar, la serpina se une al dominio catalítico de la proteasa de serina mediante enlaces reversibles, lo cual permite que se lleve a cabo la segunda reacción, en la que la proteasa escinde parte de la serpina, de modo que se forma un enlace covalente entre el grupo hidroxilo de la serina que se encuentra en la tríada catalítica de la proteasa de serina y un grupo carboxilo presente en el centro reactivo de la serpina (52,54,67). De esta forma, se genera un complejo irreversible serpina-enzima unido por enlaces covalentes que es inactivo (71). De forma general, después de la inhibición se forma un complejo cuaternario plasmina-activador-inhibidor-receptor que es eliminado de la membrana mediante la internalización por parte de miembros de la familia de lipoproteínas de baja densidad (72,73) para ser posteriormente degradado por la vía lisosomal (60).

2.2.5. El papel de la plasmina

La proteína clave del sistema fibrinolítico es la plasmina, cuyo fin último es digerir la fibrina del coágulo sanguíneo en productos de degradación solubles. No obstante, y debido a su actividad proteolítica de amplio espectro, la plasmina es capaz de desarrollar su acción frente a otros muchos sustratos más allá de la fibrina (57,58). Así, la plasmina es capaz de degradar diversos componentes de la matriz extracelular como colágeno, fibronectina y laminina (65), por lo que junto al sistema de metaloproteasas de matriz (MMP), el papel de la plasmina es clave en procesos biológicos que requieren remodelación de la matriz extracelular (57). El sistema de MMP representa una potente maquinaria de degradación y remodelación de la matriz extracelular y está formado por enzimas que

en situaciones basales están presentes en forma de zimógenos. *In vitro*, la plasmina es capaz de activar diferentes MMP (55,65,68), y experimentos *in vivo* demuestran que su participación es esencial para la activación de la pro-MMP9 segregada por macrófagos durante la respuesta inflamatoria (54).

Por lo tanto, a través de su componente principal, la plasmina, el sistema fibrinolítico es un potente regulador de los procesos de degradación y remodelación de la matriz extracelular, directamente mediante la digestión de algunos de sus componentes e indirectamente a través de la activación de diversas MMP (54). Estas funciones hacen de la plasmina un recurso potencialmente beneficioso para los agentes infecciosos, ya que su capacidad de migración hacia otros tejidos podría verse incrementada. De un modo similar, la explotación de esta enzima por parte de parásitos sanguíneos podría controlar la formación de coágulos en su hábitat intravascular. De hecho, diferentes organismos patógenos (desde bacterias y hongos a parásitos) han desarrollado a lo largo de la evolución mecanismos para explotar las funciones del sistema fibrinolítico del hospedador, lo que convierte a la plasmina en una enzima importante durante el progreso y establecimiento de algunas enfermedades infecciosas (8,74).

Sustratos adicionales de la plasmina son los factores de coagulación V y VIII, algunas hormonas, factores de crecimiento, la trombopoyetina, moléculas de adhesión intercelular (cadherinas), quimioquinas y los factores del complemento C3 y C5, entre otros. A través de estos, la plasmina también está implicada en la regulación de procesos inflamatorios, la embriogénesis, la ovulación, el neurodesarrollo y la activación hormonal (55,57,58,61,62). Además, la plasmina expresada en la superficie de las cepas virulentas de algunas bacterias es capaz de degradar anticuerpos opsonizantes (75). Esto, junto con su actividad proteolítica sobre los factores del complemento C3 y C5, hace de la plasmina una enzima muy útil para la evasión del sistema inmune por parte de organismos patógenos.

Este gran número de sustratos sobre los cuales la plasmina puede llevar a cabo su función proteolítica implica la necesidad de una estricta regulación de la actividad del sistema. En caso contrario, podría producirse un escenario patológico. De hecho, la sobre-activación del sistema fibrinolítico ha sido relacionada con situaciones patológicas tan importantes como el crecimiento de la placa arterial, la aterosclerosis crónica, síndromes coronarios agudos, restenosis e incluso cáncer. Estas patologías vasculares están basadas en la relación directa existente entre la sobre-expresión de la plasmina y los activadores fibrinolíticos (t-PA y u-PA) y la aparición de mecanismos patogénicos tan importantes como la proliferación y migración celular, la degradación de la matriz extracelular y la inflamación. Esto supone que la plasmina sea actualmente considerada como una interesante diana terapéutica desde diversos puntos de vista (57,65,76).

OBJETIVO 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE LA INTERACCIÓN DE ENDOPARÁSITOS DEL SER HUMANO CON EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO DE SUS HOSPEDADORES

3.1. Introducción

De un modo similar a las células inflamatorias y cancerígenas, las bacterias y otros patógenos también utilizan el sistema plasminógeno (PLG)/plasmina del hospedador para migrar hacia otros tejidos, colonizar otras partes del organismo y evadir la respuesta inmune de su hospedador vertebrado. En general, los patógenos que emplean esta estrategia expresan en sus superficies o excretan proteínas de unión a PLG (PLG-R) que promueven su conversión a plasmina mediante la acción del activador tisular del PLG (t-PA) y el activador del PLG de tipo uroquinasa (u-PA). Además, este mecanismo protegería dicha generación de la actividad de su inhibidor alfa-2-antiplasmina (α 2-AP), ya que generalmente tanto los receptores como el inhibidor se unen a la plasmina mediante los mismos dominios *Kringle* presentes en esta (77). El uso del sistema PLG/plasmina del hospedador por parte de agentes infecciosos tan diferentes representa un ejemplo de convergencia evolutiva en el que especies no relacionadas filogenéticamente desarrollan estrategias similares para llevar a cabo ciertas funciones biológicas.

El objetivo de esta revisión bibliográfica es ofrecer una actualización sobre el conocimiento actual de la interacción de los endoparásitos del ser humano con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores vertebrados.

3.2. Metodología

Para esta revisión se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica basada en la metodología propuesta por la declaración PRISMA para la realización de revisiones sistemáticas (78). Dicha búsqueda estuvo restringida a aquellos artículos publicados en los últimos 10 años debido a la existencia de dos revisiones publicadas en 2013 (74) y 2016 (8), donde se realiza un análisis similar. La búsqueda de todos los artículos relevantes publicados en el periodo 2010-2020 sobre la interacción entre endoparásitos del ser humano con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores se realizó en la base de datos *PubMed* (último acceso en marzo de 2020) y los términos de búsqueda empleados fueron los siguientes: “*parasite*” más “*fibrinolysis*”, “*fibrinolytic system*”, “*plasmin*” o “*plasminogen*”. Dicha búsqueda ofreció 137 resultados, de los cuales 83 artículos fueron seleccionados después de eliminar duplicidades. De estos, 45 artículos fueron descartados tras leer sus resúmenes debido a que: el tema no se correspondía con el objeto de esta revisión (15 artículos); eran estudios en ectoparásitos (vectores artrópodos y trematodos monogéneos) (8 artículos) o endoparásitos exclusivos de animales (5 artículos); eran revisiones (15 artículos) o no fue posible el acceso al texto completo de la publicación (2 artículos). Los 38 artículos restantes fueron analizados exhaustivamente e incluyeron estudios llevados a cabo en diferentes grupos de parásitos: protozoos (17 artículos), nematodos (12 artículos), cestodos (1 artículo) y trematodos (8 artículos). Un resumen gráfico de los criterios utilizados para la inclusión de los artículos en esta revisión se encuentra en la [Figura 8](#).

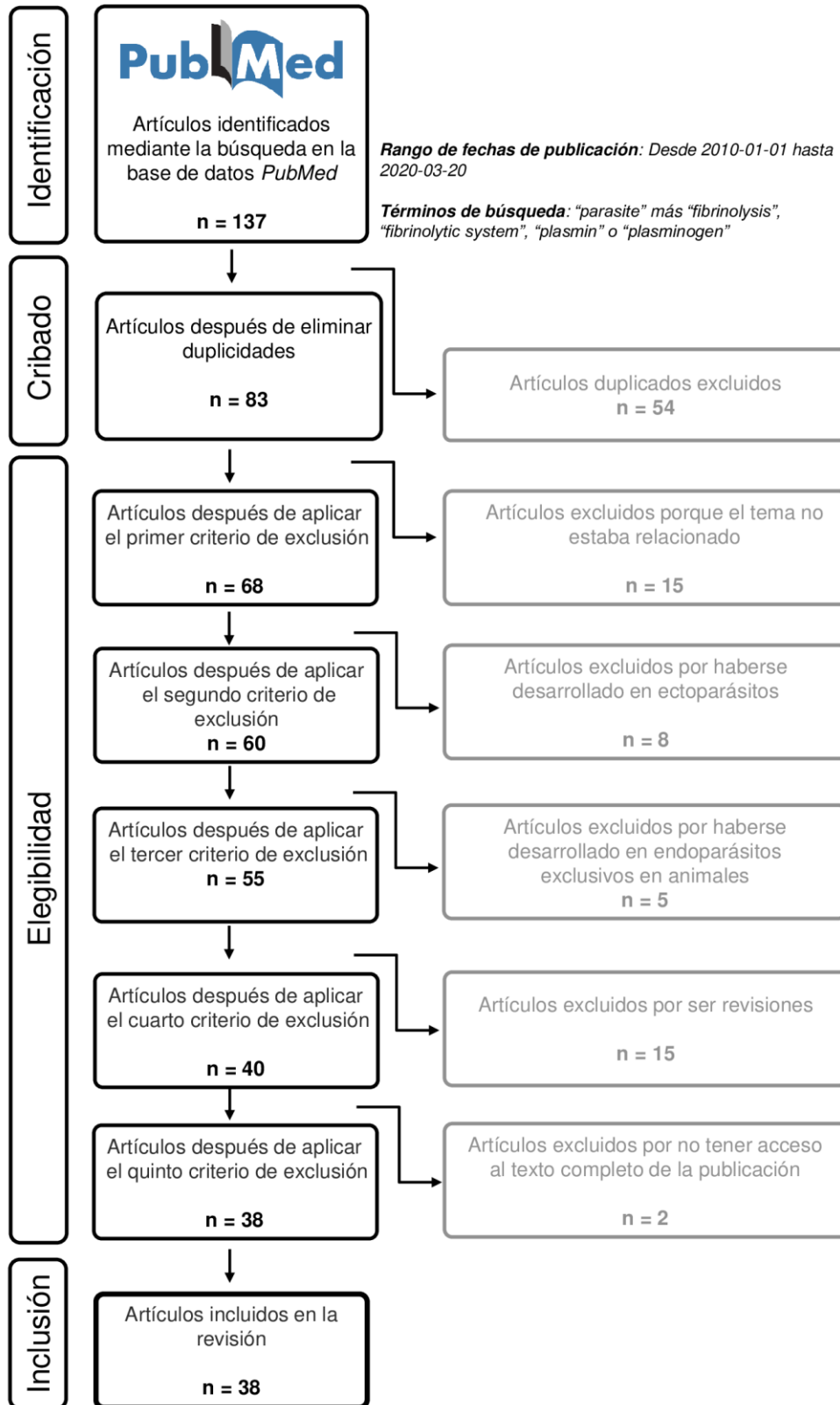


Figura 8. Diagrama de flujo para la inclusión de artículos en la revisión. Este diagrama representa de forma gráfica la metodología utilizada en la selección de los artículos incluidos en esta revisión bibliográfica en base a los criterios de exclusión establecidos, según lo propuesto por la declaración PRISMA para la realización de revisiones sistemáticas (78).

3.3. Discusión

Considerando los 38 artículos analizados, la interacción de los endoparásitos del ser humano con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores se vinculó mayoritariamente con procesos de migración parasitaria a través de los tejidos del hospedador, lo que mejoraría su capacidad invasiva y convertiría a los PLG-R parasitarios identificados en importantes factores de virulencia. Dicha interacción fue también relacionada con mecanismos parasitarios de evasión de la respuesta inmune, así como con la regulación de la cascada de coagulación, lo que facilitaría la supervivencia del parásito dentro de su hospedador. La explotación del sistema fibrinolítico puede ser especialmente beneficiosa para parásitos que viven dentro de los vasos sanguíneos de sus hospedadores, como es el caso del nematodo *Dirofilaria immitis* (79–81) o los trematodos del género *Schistosoma* (82–84), ya que esta interacción podría facilitar la degradación de coágulos intravasculares y evitar así ser inmovilizados por la formación de una red de fibrina a su alrededor, asegurando así la supervivencia del parásito dentro del sistema vascular del hospedador.

Por lo tanto, en base a los artículos analizados, la interacción de los parásitos con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores está principalmente relacionada con su capacidad de virulencia y de supervivencia dentro de sus hospedadores vertebrados, lo que está de acuerdo con la información recogida en revisiones anteriores (8,74). A continuación, se presenta una descripción más detallada de los aspectos más interesantes relacionados con la interacción parásito-sistema fibrinolítico recogidos en los artículos incluidos en esta revisión.

3.3.1. Proteínas parasitarias que interaccionan con el sistema fibrinolítico

La [Tabla 2](#) recoge un resumen de todas las proteínas relacionadas con el sistema fibrinolítico expresadas por diferentes endoparásitos del ser humano identificadas entre 2010 y 2020 en los artículos incluidos en esta revisión bibliográfica. Las proteínas identificadas antes de 2010 están recogidas en la revisión de González-Miguel et al. (8).

El análisis de la interacción de estas proteínas parasitarias con el sistema fibrinolítico del hospedador reveló que la inmensa mayoría de ellas pueden actuar como receptores del PLG. No obstante, para que dicha unión sea efectiva y conlleve la generación de plasmina, precisan de la actividad de los activadores fisiológicos t-PA y/o u-PA. En referencia a estas moléculas, en experimentos llevados a cabo con el nematodo *D. immitis*, se demostró la capacidad de sus antígenos excretorios/secretorios (E/S) para inducir un aumento en la expresión de dichos activadores (t-PA, u-PA), así como un descenso en la del inhibidor de los activadores del plasminógeno 1 (PAI-1) en un modelo *in vitro* de células de la pared arterial. Esto estaría en consonancia con una actividad pro-fibrinolítica del parásito, no solo mediante la unión de PLG en su superficie, sino también modulando la expresión de otros componentes fibrinolíticos en las células del hospedador (81,85,86).

Finalmente, apenas unos pocos estudios han conseguido identificar proteínas parasitarias con actividad catalítica directa sobre el PLG. Así, en un trabajo publicado en 2018, Leontovyc et al. (82) identificaron una proteasa de *Schistosoma mansoni*, SmSP2, capaz de escindir el PLG y generar plasmina catalíticamente activa. Esta proteasa fue también capaz de escindir el t-PA de cadena única

generando su forma de doble cadena, que tiene unas 10 veces mayor actividad proteolítica que la primera. Además, SmSP2 también tuvo actividad sobre el fibrinógeno y otras proteínas plasmáticas. Todo esto se observó mediante ensayos *in vitro*, de modo que la relevancia funcional que esta proteína tiene en la capacidad de migración del parásito durante la infección es por el momento desconocida.

La capacidad de *Plasmodium falciparum* para expresar proteasas que son capaces de escindir directamente el PLG también fue demostrada (87). Sin embargo, estos antígenos no se consideraron activadores de PLG como tales ya que no generan plasmina, sino moléculas similares a angiostatina que, potencialmente, promoverían la supervivencia del parásito dentro del hospedador mediante la inhibición del reclutamiento de macrófagos y monocitos. La identidad de estas proteasas y su relevancia funcional en infecciones por *P. falciparum* no ha sido abordada y sigue siendo un asunto interesante para futuras investigaciones.

Tabla 2. Proteínas expresadas por endoparásitos del ser humano relacionadas con el sistema fibrinolítico de los hospedadores vertebrados identificadas entre 2010 y 2020.

Proteína	Parásito		Función	Localización ^a	Estadio de desarrollo ^a	Función biológica ^b	Ref.
Actina	<i>Dirofilaria immitis</i> [1]	N	PLG-R	Superficie, segregada	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(80,85)
	<i>Ascaris suum</i>	N	PLG-R	Superficie	Larva	Migración, invasión	(88)
Anexina	<i>Clonorchis sinensis</i>	TD	PLG-R	Superficie, somática	Adulto, metacercaria	Inmuno-regulación	(89)
Beta-galactosidase binding-lectin	<i>Dirofilaria immitis</i>	N	PLG-R	Superficie	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(80)
Catepsina L	<i>Fasciola hepatica</i>	TD	PLG-R	Segregada	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia, penetración BHE	(9)
Enolasa	<i>Giardia intestinalis</i>	P	PLG-R	N/A	N/E	Fibrinólisis	(90)
	<i>Schistosoma mansoni</i>	TD	PLG-R	Superficie	Adultos	Fibrinólisis, supervivencia	(84)
	<i>Leishmania mexicana</i>	P	PLG-R	Superficie	Vesículas	Migración, invasión	(91)
	<i>Plasmodium berghei/falciparum</i>	P	PLG-R	Superficie	Ooquinetos	Desarrollo	(92)
	<i>Trichinella spiralis</i>	N	PLG-R	Superficie	Todos	Migración, invasión	(93)
	<i>Babesia microti</i>	P	PLG-R	Superficie, citosol	Intraeritrocítico	Migración, invasión	(94)
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	P	PLG-R	Superficie	Ooquiste	Migración, invasión	(95)
	<i>Clonorchis sinensis</i>	TD	PLG-R	Superficie, segregada	Adulto, cercaria, metacercaria, huevo	Migración, supervivencia	(96)
	<i>Schistosoma japonicum</i>	TD	PLG-R	Superficie, somática	Adulto, esquistosómula	Migración, desarrollo	(97)
<i>Taenia solium</i>	C	PLG-R	Tegumento vejiga [2]	Larva	Migración, invasión	(98)	

Proteína	Parásito		Función	Localización ^a	Estadio de desarrollo ^a	Función biológica ^b	Ref.
	<i>Dirofilaria immitis</i>	N	PLG-R	Superficie	Adulto	Migración, invasión	(80)
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	P	PLG-R [3]	Superficie	Adulto	Adhesión, virulencia	(99)
	<i>Fasciola hepatica</i> [4]	TD	PLG-R	Segregada	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia, penetración BHE	(9)
FBAL	<i>Ascaris suum</i>	N	PLG-R	Superficie	Larva	Migración, invasión	(88)
	<i>Trichinella spiralis</i>	N	N/A	Superficie, somática, segregada	Adulto, larva	Respuesta inmune	(100)
	<i>Dirofilaria immitis</i> [1]	N	PLG-R	Superficie	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(80)
	<i>Fasciola hepatica</i>	TD	PLG-R	Segregada	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia, penetración BHE	(9)
Galectina	<i>Dirofilaria immitis</i> [1]	N	PLG-R	Superficie, segregada	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(80,85)
GAPDH	<i>Clonorchis sinensis</i>	TD	PLG-R	Superficie, somática	Adulto, metacercaria, huevo	Migración, invasión	(101)
	<i>Babesia microti</i>	P	PLG-R	N/A	Intraeritrocítico	Migración, invasión	(102)
	<i>Ascaris suum</i>	N	PLG-R	Superficie	Larva	Migración, invasión	(88)
	<i>Schistosoma mansoni</i>	TD	PLG-R	Superficie	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(103)
	<i>Dirofilaria immitis</i> [1]	N	PLG-R	Superficie	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(80,85)
	<i>Fasciola hepatica</i>	TD	PLG-R	Segregada	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia, penetración BHE	(9)
Hsp60	<i>Dirofilaria immitis</i>	N	PLG-R	Segregada	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(85)
Immunoglobulin I-set domain containing protein	<i>Dirofilaria immitis</i>	N	PLG-R	Superficie	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(80)
LACK	<i>Leishmania mexicana</i>	P	PLG-R	Superficie, segregada	Promastigote	Migración, invasión	(104)
LOAG-14743	<i>Dirofilaria immitis</i>	N	PLG-R	Segregada	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(85)
Major sperm protein	<i>Dirofilaria immitis</i>	N	PLG-R	Superficie	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(80)
OPB	<i>Leishmania donovani</i>	P	Proteasa de serina	N/A	Promastigote, amastigote	Inhibir respuesta macrófagos	(105)
Ov87	<i>Dirofilaria immitis</i>	N	PLG-R	Segregada	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(85)
Ovcyp-2	<i>Dirofilaria immitis</i>	N	PLG-R	Superficie	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(80)
P22U	<i>Dirofilaria immitis</i>	N	PLG-R	Segregada	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(85)
Proteasas	<i>Plasmodium falciparum</i>	P	Escindir PLG [5]	Citosol	Intraeritrocítico	Inhibir reclutamiento céls. inflamatorias	(87)
SMP-1	<i>Leishmania mexicana</i>	P	PLG-R	Intravesicular	Vesículas	Migración, invasión	(91)

Proteína	Parásito		Función	Localización ^a	Estadio de desarrollo ^a	Función biológica ^b	Ref.
SmSP2	<i>Schistosoma mansoni</i>	TD	PA, activador t-PA, degrada fibrinógeno	Superficie (solo machos), segregada	Adulto	Migración, invasión	(82)
SmVAL18	<i>Schistosoma mansoni</i>	TD	PLG-R	Segregada	Cercarias	Migración, invasión	(106)
Transglutaminasa	<i>Dirofilaria immitis</i>	N	PLG-R	Segregada	Adulto	Fibrinólisis, supervivencia	(85)

(a) La ausencia de alguna de las fracciones (superficie, segregada, otras) o estadios de desarrollo del parásito no necesariamente implica que la proteína no se detecta en estos, sino que también puede reflejar el hecho de que dichas fracciones/estadios no hayan sido analizadas en el artículo en cuestión. (b) Función biológica propuesta para la interacción entre la proteína parasitaria y el sistema plasminógeno (PLG)/plasmina. No siempre dicha función es respaldada por ensayos funcionales. **PLG-R**: proteína de unión a PLG o receptor de PLG; **PA**: activador de plasminógeno; **N**: nematodo; **TD**: trematodo digeico; **C**: cestodo; **P**: protozoo. **N/A**: no abordado; **N/E**: no especificado; **FBAL**: fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; **GAPDH**: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; **Hsp60**: proteína de choque térmico (*heat-shock protein*) 60; **LACK**: receptor de quinasa C activada de *Leishmania*; **OPB**: oligopeptidasa B; **SMP-1**: proteína pequeña miristoilada (*small myristoylated protein*) 1; **SmSP2**: proteasa de serina 2 de *S. mansoni*; **SmVAL18**: *venom allergen-like protein* 18 de *S. mansoni*; **BHE**: barrera hematoencefálica. [1] Estudios posteriores demuestran que estas proteínas están también implicadas en la aparición de endarteritis proliferativa, la característica fisiopatológica más distintiva de la dirofilariosis cardiopulmonar (81,107). [2] Se considera que la pared vesicular de *T. solium* sintetiza los productos E/S que se envían al tegumento del parásito para ser excretados (98). [3] Publicado en artículos anteriores (108). En este estudio los autores caracterizan las propiedades moleculares de las nueve enolasas expresadas por *T. vaginalis*. [4] La enolasa en productos de excreción/secreción de adultos de *F. hepatica* había sido identificada en publicaciones anteriores (10). [5] Estas proteasas escinden el PLG en moléculas similares a angiotatina pero no lo activan a plasmina. La identidad de estas proteasas no es abordada.

La proteína parasitaria más comúnmente utilizada para la unión de PLG en los artículos revisados fue la **enolasa** (Tabla 2). Igual que GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y FBAL (fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa), la enolasa es una enzima metabólica, principalmente intracelular, que participa en la glucólisis y que es esencial en organismos que están desprovistos del ciclo de *Krebs*. No obstante, también puede localizarse en la superficie de muchos parásitos (8) y también de bacterias patogénicas (74) llevando a cabo otras importantes funciones. La enolasa de estos parásitos es capaz de unirse al PLG del hospedador y generar plasmina en la superficie, lo que permite a estos colonizar diferentes tejidos del hospedador (109). Igual que la mayoría de proteínas parasitarias de superficie que unen PLG, la enolasa carece de péptido señal y de dominios transmembranales, de modo que su mecanismo de localización en la superficie es desconocido y se cree que se lleva a cabo mediante rutas no convencionales (109,110). Las enolasas parasitarias han sido, además, estudiadas como posibles dianas para el desarrollo de vacunas (109) (Ver Tabla 3 en Sección 3.3.5) así como por su importancia a la hora de activar el sistema inmune de los hospedadores vertebrados (105).

La importancia de las proteínas de unión a PLG en la virulencia y supervivencia de los parásitos se evidencia en un estudio proteómico en el que se demostró que, contrariamente a lo observado en formas atenuadas de *Histomonas meleagridis* (protozoo), un parásito animal, sus formas virulentas sobre-expresan GAPDH y FBAL (111), que son proteínas identificadas en múltiples especies de parásitos como receptores de PLG (8) (Tabla 2). Además, las proteínas sobre-expresadas identificadas en este estudio contenían modificaciones postraduccionales que respaldan la idea de

que su sobre-expresión está relacionada con mecanismos independientes a sus clásicas funciones glucolíticas, como por ejemplo la unión de PLG y la activación de plasmina (111).

3.3.2. Mecanismos de interacción entre las proteínas parasitarias y el sistema fibrinolítico de sus hospedadores

La mayoría de los 38 artículos revisados describen proteínas capaces de unir PLG y de actuar, por tanto, como sus receptores. En todos estos artículos, se demostró la dependencia entre la unión de PLG y los residuos de lisina presentes en las proteínas parasitarias, ya que ensayos de competición con análogos de lisina, como el ácido aminocaproico (ϵ -ACA), inhibieron dicha unión. La única excepción a esta premisa fue la enolasa TsEno expresada por *Taenia solium* (cestodo), cuya unión a PLG no fue inhibida en presencia de ϵ -ACA (98). En relación a esto, estudios anteriores con otras enolasas parasitarias también observaron que el ϵ -ACA no es un buen inhibidor de la unión de esta proteína al PLG, lo que sugiere la existencia de mecanismos de unión al PLG diferentes al mediado por lisinas, por lo menos en la familia de las enolasas. No obstante, estos experimentos no incluyeron una condición en la que se inhibiera la unión a PLG de una proteína cuya unión sí se hubiera descrito como dependiente de residuos de lisina como control positivo, lo cual hubiera asegurado que el ϵ -ACA utilizado en los experimentos funciona.

Como se ha introducido en el punto anterior, todos los artículos analizados que describen proteínas de unión al PLG y que miden su activación en la superficie del parásito muestran que dicho mecanismo depende de la presencia de los activadores t-PA o u-PA derivados del hospedador. El único artículo en el que esta dependencia no es obvia es el llevado a cabo por Acosta et al. (112). En este estudio, la adición de u-PA a la reacción no incrementó la generación de plasmina en comparación con la condición donde se incubó el protozoo *Trypanosoma evansi* solo con PLG. No obstante, esto podría deberse a que los parásitos utilizados para el ensayo de generación de plasmina fueron aislados de sangre de ratas infectadas y, posiblemente, ya tenían en su superficie moléculas de plasmina que fueron generadas por activadores presentes en la sangre del hospedador antes de ser aislados de su ambiente nativo. Por lo tanto, sigue siendo válida la visión de que la unión de PLG a la superficie del parásito depende de residuos de lisina y que dicha unión facilita la conversión del PLG a plasmina por parte de los activadores t-PA y u-PA expresados por las células del hospedador (8,109).

A parte de la explotación del sistema fibrinolítico de los hospedadores para incrementar la virulencia y la supervivencia de los parásitos, en el caso de *P. falciparum* (protozoo), uno de los agentes causales de la malaria, la unión de PLG a su superficie y la consecuente generación de plasmina fue también relacionada con el desarrollo del propio parásito (92). *P. falciparum* expresa una enolasa que, además de su potencial implicación en la migración del parásito dentro del hospedador vertebrado, es importante para su desarrollo dentro del mosquito que lo transmite. Dentro del vector, la enolasa que se encuentra en la superficie de *P. falciparum* captura el PLG de la sangre succionada por el mosquito y se genera plasmina, lo que resulta esencial para la invasión del tubo digestivo del mosquito y el desarrollo del parásito dentro del vector. Sin la invasión del tubo digestivo, las formas infectivas del parásito no llegan a las glándulas salivales del mosquito y se interrumpe la transmisión

del parásito a los huéspedes vertebrados. Este proceso es dependiente de la generación de plasmina, ya que en experimentos con sangre que contiene una forma de PLG que presenta una mutación en el sitio activo de la plasmina, el grado de invasión del intestino medio por parte de los ooquistos es igual al obtenido cuando se expone a los mosquitos a sangre infectada desprovista de PLG (92). Estos resultados tienen aplicaciones prácticas interesantes, ya que el bloqueo de la unión del PLG a la enolasa de *P. falciparum* mediante un inhibidor segregado por parte de bacterias simbióticas modificadas genéticamente introducidas dentro de los mosquitos bloquea el desarrollo del parásito y potencialmente interrumpe la transmisión de la enfermedad (113).

Entre todos los artículos analizados en esta revisión, destaca por su peculiaridad un ejemplo de mecanismo de explotación del sistema PLG/plasmina del hospedador por parte de *Toxoplasma gondii*. Este protozoo intracelular obligado estimula la secreción de un complejo multi-proteico por parte de los macrófagos del hospedador que infecta y que incluye formas activas de la metaloproteasa 9 (MMP-9) y el receptor de u-PA asociado a glicosilfosfatidilinositol (uPAR), convirtiendo así a los macrófagos infectados en herramientas eficaces para facilitar la diseminación del parásito y cruzar barreras biológicas difícilmente franqueables, como la barrera hematoencefálica (114). A pesar de que los autores no examinan si el incremento de la capacidad migratoria de los macrófagos infectados es dependiente de la generación de plasmina, es muy posible que así sea ya que se conoce que los macrófagos necesitan la actividad de la plasmina para convertir la pro-MMP9 en su forma activa (54) (ver [Sección 2.2.5](#)).

3.3.3. Localización de las proteínas de interacción con el sistema fibrinolítico de los hospedadores

Los parásitos expresan tanto proteínas de superficie (la mayoría de los artículos analizados en esta revisión) como antígenos E/S (85,106) capaces de unir PLG, encontrándose estas proteínas en casi todos los estadios de desarrollo de los parásitos, desde huevos (96) y formas inmaduras (88,98,106) a adultos (83,96) ([Tabla 2](#)). Curiosamente, las bacterias del género *Wolbachia*, simbiontes de un gran número de especies de filarias, también unen PLG en su superficie (115), lo cual fue relacionado con su posible participación en la patogénesis de la infección y explicaría, al menos en parte, el hecho de que estas bacterias invadan los tejidos del hospedador después de la administración de tratamientos filaricidas. Proteínas de unión a PLG han sido también identificadas en vesículas secretadas por el protozoo *Leishmania mexicana*, y aunque la generación de plasmina no fue analizada en este caso, posiblemente contribuyan a la propagación del parásito por el organismo del hospedador (91).

La mayoría de las proteínas fijadoras de PLG identificadas en los artículos revisados tanto en el presente trabajo, como en revisiones anteriores (8), fueron proteínas intracelulares con roles citoplasmáticos mayoritariamente relacionados con el metabolismo celular. No obstante, para poder unirse al PLG del hospedador estas proteínas deben ser re-localizadas a la superficie del parásito. Muchas de estas proteínas de unión al PLG no contienen péptidos señal ni dominios transmembranales, por lo que el mecanismo mediante el cual se localizan en la superficie del parásito es actualmente desconocido (99,109,110). Se han propuesto diferentes mecanismos de transporte de estas proteínas a la superficie del parásito, incluyendo transporte a través de rutas no

convencionales, tal y como es el caso de la enolasa del protozoo *Trichomonas vaginalis* (110), la adquisición de modificaciones postraduccionales que permitan el anclaje de la proteína en la membrana plasmática, así como la formación de interacciones estables con otras proteínas constitutivamente expresadas en la superficie del parásito (62,63).

El conocimiento de las rutas de localización de las proteínas de unión de PLG parasitarias es importante, ya que permitiría el diseño de estrategias terapéuticas frente a estos mecanismos, lo cual redundaría en la disminución de la virulencia parasitaria. Además, si la expresión de estas proteínas de unión a PLG es constitutiva o responde a estímulos tampoco se ha estudiado con detalle, aunque se ha postulado que la localización superficial de una enolasa fijadora de PLG de *T. vaginalis* responde a incrementos en la concentración de glucosa (110).

3.3.4. Equilibrio entre supervivencia del parásito y patogénesis en el hospedador

En ocasiones, la interacción de los parásitos con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores puede estar también en relación con mecanismos patogénicos asociados a las infecciones parasitarias, generando así la necesidad de mantener un equilibrio entre la supervivencia del parásito y los efectos deletéreos que su presencia provoca en el hospedador vertebrado. Este equilibrio ha sido propuesto en el caso de la dirofilariosis cardiopulmonar, causada por el nematodo *D. immitis*, y podría ser extrapolado a otras enfermedades parasitarias. La dirofilariosis cardiopulmonar es una enfermedad zoonótica que afecta principalmente a perros y gatos, y que se caracteriza por la presencia de vermes adultos de *D. immitis* en las arterias pulmonares y el ventrículo derecho de los hospedadores. Estos vermes pueden sobrevivir durante años en su hábitat intravascular, causando una patología inflamatoria crónica (79).

En general, los parásitos que residen en el sistema vascular, como *D. immitis*, utilizan el sistema PLG/plasmina de sus hospedadores para evitar la formación de coágulos de fibrina a su alrededor (79–84). No obstante, un aumento excesivo en los niveles de t-PA, u-PA o plasmina, como el causado por *D. immitis* (81,85,86), está también relacionado con aterosclerosis, síndromes coronarios agudos, restenosis y remodelado vascular (8), todas ellas situaciones deletéreas para el hospedador (Sección 2.2.5). Además, se ha demostrado que la plasmina resultante de la unión entre el PLG y antígenos de *D. immitis* induce la proliferación, así como el aumento de la capacidad invasiva de células endoteliales y musculares lisas caninas (81,86,107), que son procesos que finalmente causan la aparición de endarteritis proliferativa, la característica fisiopatológica más distintiva de la dirofilariosis cardiopulmonar.

La activación excesiva del sistema PLG/plasmina también se observa en enfermedades autoinmunes y cáncer, lo que confirma las consecuencias negativas que puede tener un exceso de fibrinólisis en contextos patológicos (8). Por lo tanto, la explotación del sistema fibrinolítico de los hospedadores por parte de los parásitos tiene que ser finamente regulada con el objetivo de mantener un equilibrio entre los beneficios obtenidos por el parásito (aumento de su capacidad de virulencia y supervivencia) y las consecuencias patogénicas a largo plazo generadas en el organismo del hospedador.

3.3.5. Proteínas de interacción con el sistema fibrinolítico como candidatas para el desarrollo de vacunas antiparasitarias

Una de las aplicaciones más interesantes de las proteínas de unión a PLG encontradas en los artículos analizados para esta revisión es su empleo en ensayos vacunales. Muchas de estas proteínas son enzimas metabólicas que tienden a estar altamente conservadas entre diferentes especies (109), pero que aun así presentan pequeñas diferencias con las proteínas homólogas de los hospedadores (99) y, por lo tanto, representan antígenos con potencial para ensayos de inmunización. Esto las convierte también en buenas candidatas para el diseño de fármacos y técnicas de diagnóstico más específicas. En la [Tabla 3](#) se muestra un resumen de los resultados publicados sobre inmunización animal con este tipo de proteínas en los últimos 10 años.

Tabla 3. Ensayos de vacunación con proteínas de endoparásitos del ser humano que interaccionan con el sistema fibrinolítico de los hospedadores publicados entre 2010 y 2020.

Proteína	Función	Parásito	% protección	Método	Animal	n/grupo	Ref.
Anexina	PLG-R	<i>Clonorchis sinensis</i> (trematodo)	N/A [1]	Perfil citoquinas	Rata	N/E	(89)
Enolasa	PLG-R	<i>Babesia microti</i> (protozoo)	alrededor del 40%	nº eritrocitos infectados y detección rRNA parasitario por qPCR	Ratón	4	(94)
	PLG-R	<i>Schistosoma japonicum</i> (trematodo)	24.28% (huevos en hígado) y 21.45% (huevos en heces)	Conteo huevos (en hígado y heces)	Ratón	10	(97)
FBAL	PLG-R	<i>Trichinella spiralis</i> (nematodo)	48.7% (nº vermes adultos) y 52.5% (nº larvas musculares)	nº adultos en intestino y larvas por gramo de músculo	Ratón	25	(100)

FBAL: fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; **PLG-R:** receptor de plasminógeno o proteína de unión a plasminógeno; **N/A:** no abordado; **N/E:** no especificado; % **protección** se refiere al porcentaje de reducción de la carga parasitaria durante infecciones post-vacunación en animales inmunizados con respecto a los controles; **n/grupo** es el número de animales utilizados en cada grupo experimental. **[1]** Este trabajo demuestra que las ratas vacunadas con la proteína recombinante del parásito desarrollan una respuesta inmune pero no aborda si protege a los animales en futuras infecciones.

Entre 2010 y 2020 se han publicado cuatro artículos donde se analiza el potencial de proteínas parasitarias de unión a PLG en ensayos vacunales. Estos ensayos fueron llevados a cabo con proteínas de unión a PLG de *Clonorchis sinensis* (trematodo) (89), *Babesia microti* (protozoo) (94), *Schistosoma japonicum* (trematodo) (97) y *Trichinella spiralis* (nematodo) (100). El ensayo de vacunación llevado a cabo frente a *C. sinensis* solo demuestra que las ratas desarrollan una respuesta inmune después de la inmunización con la proteína recombinante, pero no aborda si esta respuesta protege a los animales de futuras infecciones (89). Si el grado de protección registrado se mantiene en el tiempo es algo que no se ha analizado en ninguno de los estudios.

3.4. Comentarios finales

En base a lo publicado en los últimos 10 años, podemos definir que la interacción de los endoparásitos del ser humano con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores está principalmente

relacionada con su capacidad de **virulencia** (migración e invasión de otros tejidos) y de **supervivencia** dentro del hospedador vertebrado (evasión del sistema inmune del hospedador e inhibición de la formación de coágulos de fibrina alrededor de los parásitos vasculares).

La unión de las proteínas parasitarias revisadas al PLG del hospedador depende de residuos de lisina que interaccionan con los dominios *Kringle* del PLG, mientras que la generación de plasmina precisa de la acción de los activadores fisiológicos t-PA y u-PA expresados por las células del hospedador. Solo se ha identificado la expresión de una proteasa capaz de activar directamente el PLG en *S. mansoni* (82). Esta proteasa no es solo capaz de activar el PLG, sino que también degrada fibrinógeno y transforma el t-PA en una variante con mayor actividad proteolítica. En los últimos 10 años también se ha descrito en *P. falciparum* una proteasa capaz de escindir el PLG, pero no se considera activadora del PLG como tal ya que el producto de la escisión no es plasmina sino moléculas similares a angiostatina que regulan la respuesta inflamatoria del hospedador (87).

Cabe destacar que en la mayor parte de los artículos publicados en este campo, las funciones biológicas de las proteínas identificadas son generalmente propuestas, y solo en unos pocos casos son evaluadas mediante ensayos funcionales en los cuales se anule la actividad de dicha proteína (RNAi, CRISPR, inhibición farmacológica o mediante anticuerpos, por ejemplo) con el fin de determinar si la capacidad de virulencia/supervivencia del parásito es alterada. No obstante, es importante recordar que, en el caso de los parásitos helmintos, estos son organismos pluricelulares formados por múltiples órganos y tejidos y, por lo tanto, estrategias de este tipo son técnicamente muy complejas. De todos los trabajos incluidos en esta revisión, el único artículo que presenta experimentos de este tipo demuestra que la inhibición de la enolasa de *S. mansoni* no se traduce en una disminución de la capacidad del parásito para generar plasmina (84), lo que sugiere que los mecanismos de activación del PLG de este parásito, y probablemente de la mayoría, son altamente redundantes. No obstante, los autores determinan la eficacia del RNAi midiendo la cantidad total de mRNA expresado, por lo que la falta de reducción en la generación de plasmina en vermes con expresión de enolasa reducida podría deberse a que la cantidad de enolasa superficial restante después de la administración del RNAi es suficiente como para sostener la unión de PLG en la superficie del parásito.

Finalmente, los procesos mediante los cuales las proteínas de unión a PLG son transportadas a la superficie del parásito, así como la identidad de los sustratos diferentes a la fibrina de la plasmina generada en la superficie, son algunas de las cuestiones que, actualmente, no se conocen en profundidad. Dado que las proteínas parasitarias con capacidad para interaccionar con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores están localizadas en la interfaz entre ambos organismos, pudiendo constituir factores de virulencia muy importantes, representan dianas con un gran potencial para el desarrollo de terapias anti-parasitarias y vacunas.

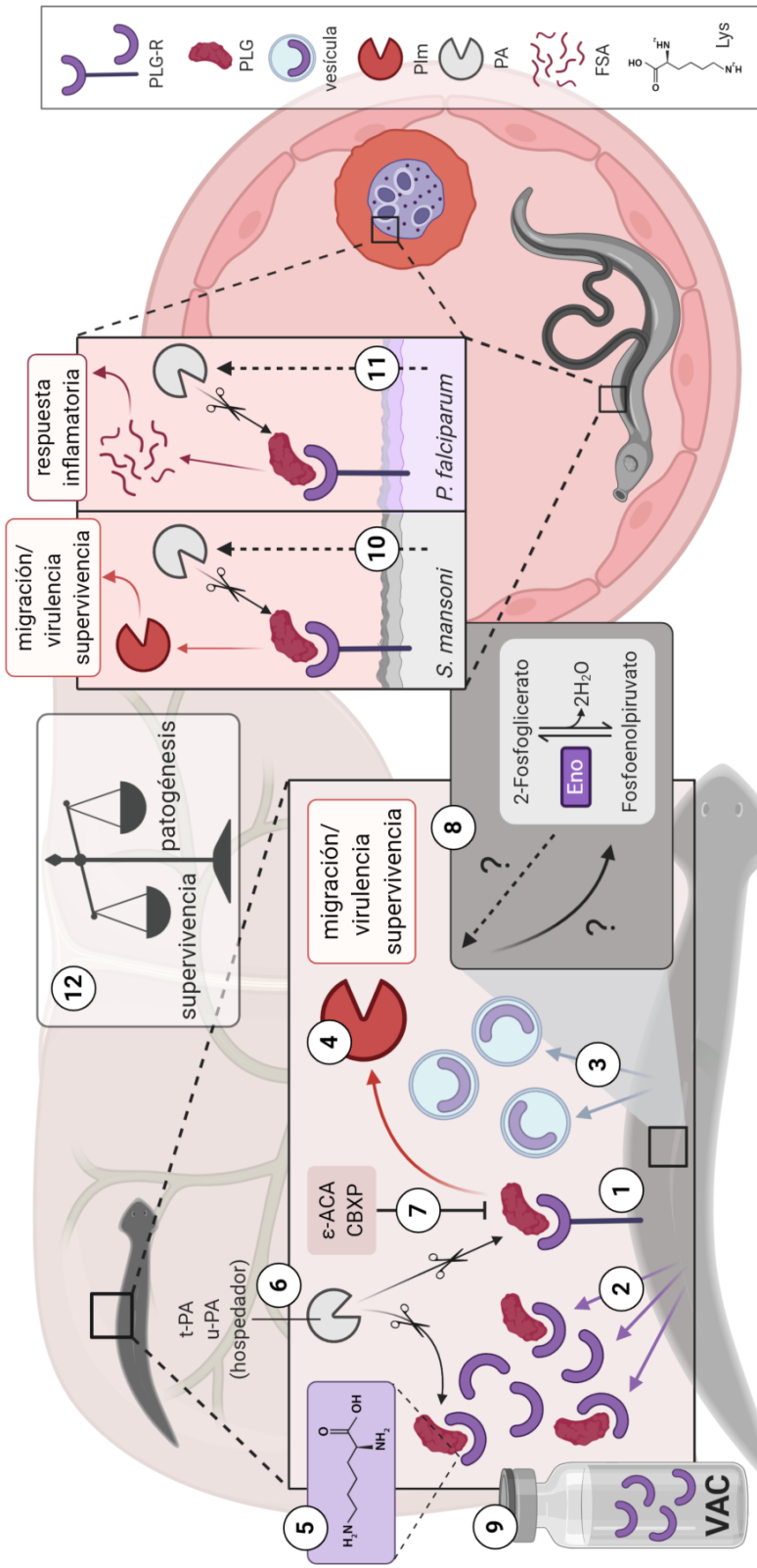


Figura 9. Interacción de endoparásitos del ser humano con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores. Esta figura representa un resumen gráfico de los aspectos más interesantes relacionados con la interacción parásito-sistema fibrinolítico recogidos en los artículos incluidos en esta revisión bibliográfica. **PLG**: plasminógeno; **PLG-R**: proteína de unión al PLG; **Plm**: plasmina; **PA**: activador del PLG; **FSA**: fragmentos similares a angiotatina; **t-PA**: activador tisular del PLG; **u-PA**: activador de tipo uroquinasa; **ε-ACA**: ácido aminocaproico; **CBXP**: carboxipeptidasa. [1,2,3]: Muchos parásitos expresan PLG-R que les permiten unir el PLG del hospedador y generar plasmina a partir de él [4], lo que repercute positivamente en su capacidad de virulencia y supervivencia dentro del hospedador y generar plasmina a partir de él [4], lo que repercute positivamente en su capacidad de virulencia y supervivencia dentro del hospedador y generar plasmina a partir de él [4]. Estos PLG-R se expresan en superficie [1] o son segregados al exterior, ya sea libres [2] o dentro de vesículas [3]. La interacción entre el PLG y sus receptores parasitarios depende de la presencia de residuos de lisina en estos últimos [5], así como de la actividad de las enzimas activadoras expresadas por las células del hospedador [6]. La dependencia de residuos de lisina queda demostrada en experimentos con ε-ACA y CBXP [7]. [8]: Los PLG-R parasitarios suelen ser enzimas intracelulares (como por ejemplo la α-enolasa, Eno) y tanto su mecanismo de re-localización a la superficie como su sensibilidad a estímulos externos es algo que no se comprende en su totalidad. [9]: Algunos PLG-R parasitarios han sido utilizados en ensayos de vacunación con eficiencias variables (Tabla 3) [10,11]: Se han identificado enzimas capaces de escindir directamente el PLG (y que actúan como PAs) en *Schistosoma mansoni* [10] y *Plasmodium falciparum* [11]. En el caso de *S. mansoni*, la proteasa tiene también actividad sobre el t-PA y el fibrinógeno y favorece la supervivencia del parásito. En el caso de *P. falciparum*, la proteasa no se considera estrictamente un PA ya que no genera plasmina sino fragmentos similares a angiotatina que modulan la respuesta inflamatoria del hospedador. *P. falciparum* también expresa PLG-R que son esenciales para su desarrollo dentro de su mosquito vector (no representado en esta figura). [12]: Una sobre-activación del sistema fibrinolítico por parte de los parásitos puede tener consecuencias patogénicas, por lo que debe existir un equilibrio entre los beneficios obtenidos por el parásito y las consecuencias negativas a largo plazo generadas en el hospedador.

OBJETIVO 4: ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA INTERACCIÓN DE LAS FASES JUVENILES DE *FASCIOLA HEPATICA* CON EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO DE SU HOSPEDADOR

Dada la importancia que tiene para muchos endoparásitos del ser humano la interacción con el sistema fibrinolítico del hospedador vertebrado (8,74), en esta sección se presenta un estudio experimental en el que se analiza si el tegumento de los vermes juveniles recién excistados de *Fasciola hepatica* (FhNEJ) es capaz de unir el plasminógeno (PLG) de su hospedador vertebrado, lo que proveería a estos parásitos de una maquinaria proteolítica en su superficie con potenciales beneficios para el inicio de su ruta migratoria hacia el hígado y la evasión del sistema inmune del hospedador.

Este estudio añade información al conocimiento sobre los mecanismos de evasión y virulencia de *F. hepatica*, cuya capacidad de segregar proteínas de unión a PLG ha sido recientemente descrita en vermes adultos (9,10), y aporta una base interesante para la identificación de proteínas de las fases juveniles de *F. hepatica* como potenciales dianas para el desarrollo de vacunas y de fármacos que aborden la infección antes de que los vermes adultos se hayan desarrollado y la enfermedad se haya establecido de forma irreversible.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Excistación de metacercarias de *F. hepatica* y obtención de las fases juveniles

La excistación de metacercarias de *F. hepatica* es un procedimiento complejo en el que se reproducen *in vitro* las condiciones biológicas bajo las cuales este proceso ocurre *in vivo* en el hospedador vertebrado. La excistación *in vitro* de metacercarias consta de dos etapas sucesivas de activación y emergencia, permitiendo el aislamiento de los juveniles recién excistados. La metodología empleada está basada en la descrita por González-Miguel et al. (116). En primer lugar, se burbujeó CO₂ en 9 ml de agua destilada fría durante 30 s, se añadió 1 ml de ditionito de sodio (Sigma) 0.2 M y se incubó la mezcla 5 min a 37 °C. A continuación, se añadió la solución a las metacercarias de *F. hepatica* (Ridgeway Research) y se dejó incubar 1 h a 37 °C. Se lavaron las metacercarias dos veces con agua destilada dejándolas sedimentar, se añadieron 3 ml de medio de excistación pH 7.4 [3 ml de *Hank's balanced salt solution* (Sigma) suplementado con 10% de bilis de cordero y 30 mM HEPES (Sigma)] y se incubó durante 4 h a 37 °C. Seguidamente, se recolectaron los juveniles recién excistados mediante una micropipeta de 200 µl (Figura 10), se centrifugaron 5 min a 300 xg y se lavaron dos veces más con 5 ml de tampón fosfato salino (PBS) pH 7.2. Después de este lavado, los juveniles se transfirieron a tubos de 1.5 ml para la extracción de la fracción antigénica del tegumento.

4.1.2. Obtención de los extractos antigénicos

El extracto antigénico de tegumento de FhNEJ (FhNEJ-Teg) se obtuvo añadiendo 200 µl del detergente no iónico Nonidet P40 (Sigma) al 1% en PBS a los FhNEJ previamente lavados, e incubando la solución resultante 30 min a temperatura ambiente en rotación suave (116). A

continuación, se centrifugó la mezcla a 300 xg durante 5 min, se transfirió el sobrenadante (fracción tegumento) a otro tubo de 1.5 ml y se añadieron 20 µl de un cóctel de inhibidores de proteasas de amplio espectro (Sigma). Tanto el FhNEJ-Teg, como el sedimento resultante de la centrifugación y que incluye las proteínas somáticas de FhNEJ, se congelaron a -80 °C hasta el momento de su utilización. El extracto antigénico excretor/secretor de *D. immitis* (DiES), utilizado como control positivo, fue suministrado por el laboratorio del Dr. Fernando Simón (Universidad de Salamanca) (85).

4.1.3. Ensayo de unión a plasminógeno

La unión de los antígenos parasitarios al PLG se analizó mediante un ensayo de tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) siguiendo la metodología descrita por González-Miguel et al. (85) con ligeras modificaciones. Se tapizaron placas de 96 pocillos (Costar) con 0.5 µg/pocillo de antígeno de FhNEJ-Teg diluido en 200 µl de tampón carbonato (TC) pH 9.6 (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃) durante toda la noche a 4 °C. Además, se incluyó en el tapizado 0.5 µg/pocillo de antígeno DiES en las mismas condiciones como control positivo de la unión de PLG, por haber sido esta función previamente demostrada con este mismo extracto antigénico (85). A continuación, los pocillos se bloquearon con 1% de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma) en PBS durante 30 min a 37 °C (200 µl) y se añadió 1 µg o cantidades crecientes (de 0 µg a 3 µg) de PLG humano (Acris Antibodies) diluido en 1% BSA-PBS durante 1 h a 37 °C (100 µl). La unión del PLG se detectó mediante la adición de una IgG anti-PLG humano desarrollada en oveja (Acris Antibodies) diluida 1:2000 (100 µl, 1 h a 37 °C), seguida del anticuerpo secundario anti-oveja conjugado con peroxidasa HRP (Sigma) diluido 1:4000 (100 µl, 1 h a 37 °C). Ambos anticuerpos se diluyeron en 1% BSA-PBS. Entre las diferentes incubaciones, los pocillos fueron lavados tres veces con 200 µl de 0.5% Tween₂₀-PBS. La reacción de revelado se llevó a cabo con 100 µL de tampón sustrato pH 5 [25 mM ácido cítrico, 45 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM orto-fenildiamina (OPD), 0.04% H₂O₂] a temperatura ambiente y, aproximadamente, 6 min más tarde se frenó la reacción añadiendo 100 µl de ácido sulfúrico 3 N. La densidad óptica (DO) de los pocillos se midió a 492 nm en un espectrofotómetro (Bio-Rad). En paralelo, se realizaron ensayos de competición con el análogo de lisina ε-ácido aminocaproico (ε-ACA) para valorar la participación de este aminoácido en la fijación del PLG. Se realizó una recta de inhibición valorando la adición de concentraciones crecientes de ε-ACA (de 0 a 100 mM) durante la incubación con PLG. Como control negativo se tapizaron pocillos con 1% BSA (diluido en TC). Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado. Los volúmenes indicados entre paréntesis corresponden al volumen utilizado por pocillo.

4.1.4. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos realizados en este trabajo se llevaron a cabo en base a la comparación de medias mediante test paramétricos. Las comparaciones entre grupos en experimentos que contienen dos grupos experimentales se hicieron mediante un test de t de Student, y en aquellos que contienen más de dos grupos experimentales se empleó un test ANOVA de un factor y el test de Tukey como prueba post-hoc para realizar las comparaciones a pares. Todos los cálculos se ejecutaron con el software de análisis estadístico R-Commander.

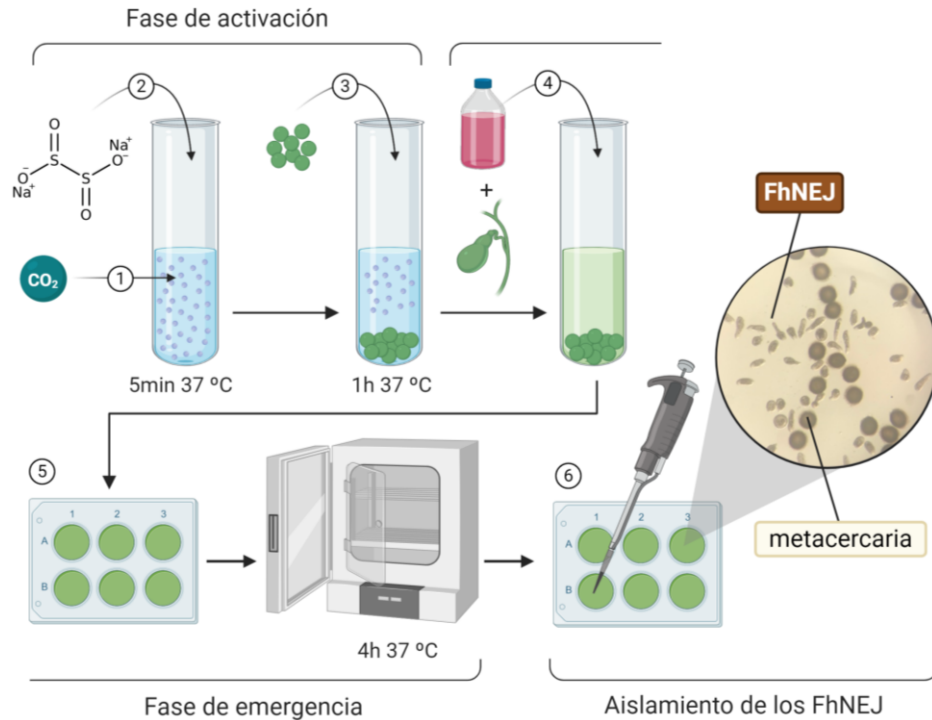


Figura 10. Excitación *in vitro* de metacercarias de *Fasciola hepatica*. La excitación *in vitro* de metacercarias de *F. hepatica* se dividió en dos fases. La fase de activación consistió en incubar las metacercarias en agua con altas concentraciones de CO_2 y en presencia de un agente reductor, el ditionito de sodio [1-3]. La fase de emergencia fue estimulada mediante la incubación de las metacercarias a 37 °C en medio suplementado con HEPES y 10% de bilis [4]. Pasadas 3-5 h de incubación a 37 °C [5], las metacercarias excistan y los FhNEJ son recogidos y aislados bajo una lupa con la ayuda de una micropipeta [6].

4.2. Resultados

4.2.1. El extracto de tegumento de FhNEJ fija plasminógeno

Con el fin de determinar si el FhNEJ-Teg era capaz de unir PLG, realizamos en primer lugar un ensayo ELISA para valorar *in vitro* dicha unión en comparación con un control positivo (DiES) y un control negativo (1% BSA). Los resultados demuestran la capacidad de FhNEJ-Teg para fijar PLG, ya que, aunque lo hace en menor grado que DiES, la DO (A492 nm) obtenida en los pocillos en los que se empleó este extracto antigénico fue significativamente superior a la obtenida en aquellos tapizados solamente con BSA ($p < 0.01$, ANOVA de un factor) (Figura 11).

4.2.2. La unión de FhNEJ-Teg a plasminógeno depende de residuos de lisina

Una vez determinada la capacidad del FhNEJ-Teg de unir PLG, nos dispusimos a analizar si dicha unión podría ser inhibida mediante la co-incubación de ambos componentes con el análogo de lisina ϵ -ACA, lo que indicaría que la unión es dependiente de residuos de lisina. Además, el FhNEJ-Teg se incubó con concentraciones crecientes de ϵ -ACA con el fin de determinar la concentración óptima de inhibición para futuros ensayos. Para todo esto se realizó un ensayo ELISA en el que se confirmó nuevamente la capacidad de unión a PLG de FhNEJ-Teg, ya que la diferencia de DO (A492 nm) con respecto al control negativo 1% BSA es significativa ($p < 0.01$, t de Student). Además, también se pudo

observar que una concentración de 25 mM de ϵ -ACA es suficiente para reducir la unión del FhNEJ-Teg al PLG hasta niveles similares a los del control negativo (diferencia no significativa, t de Student) y que, de hecho, a partir de 25 mM se alcanza una meseta en la que concentraciones crecientes de ϵ -ACA no aportan una reducción adicional de la unión entre FhNEJ-Teg y PLG (Figura 12).

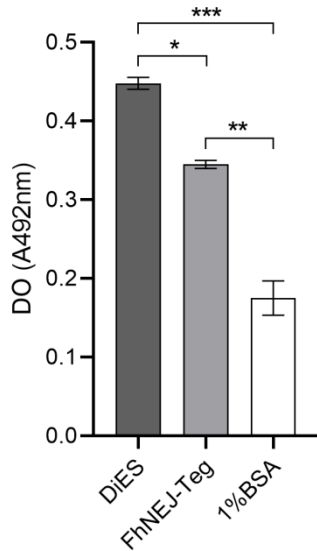


Figura 11. Unión del FhNEJ-Teg a PLG. La unión del extracto de tegumento de FhNEJ (FhNEJ-Teg) a PLG se demostró mediante un ensayo ELISA en el que se muestra que la unión es significativamente superior al control negativo 1% BSA. Esta unión es detectable con 0.5 μ g de FhNEJ-Teg. El antígeno excretor/secretor de *D. immitis* (DiES) sirve como control positivo de la unión a PLG. Se indica el promedio de dos réplicas \pm SD. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* p <0.5; ** p <0.01; *** p <0.001; ANOVA de un factor).

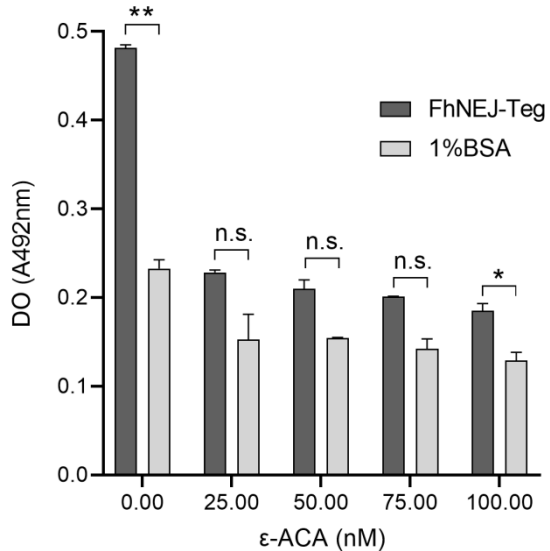


Figura 12. La unión de PLG por parte de FhNEJ-Teg depende de residuos de lisina. Este ensayo ELISA muestra que el FhNEJ-Teg une PLG de forma significativamente superior al control negativo 1% BSA y que lo hace de forma dependiente a residuos de lisina ya que la incubación con 25 mM del análogo de lisina ϵ -ACA reduce la unión entre FhNEJ-Teg y PLG hasta niveles similares a los del control negativo 1% BSA. Se indica el promedio de dos réplicas \pm SD. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* p <0.5; ** p <0.01; n.s. no significativo; t de Student).

4.2.3. El extracto de tegumento de FhNEJ fija plasminógeno de forma proporcional a la cantidad de PLG disponible

Con el objetivo de determinar si la unión de FhNEJ-Teg al PLG era proporcional a la cantidad de este último, se realizó un ensayo ELISA de unión a PLG similar a los llevados a cabo en los experimentos anteriores, pero utilizando cantidades crecientes de PLG. En paralelo se realizó un ensayo de competición mediante la co-incubación del PLG con 50 mM de ϵ -ACA en consonancia con los resultados mostrados en la Figura 12. Este experimento demostró una vez más la capacidad del FhNEJ-Teg para unir PLG, incluso cuando la cantidad de PLG añadida es baja (0.5 μ g/pocillo; p <0.001, ANOVA de un factor). Además, se observa también que la capacidad de unión a PLG del FhNEJ-Teg es directamente proporcional a la cantidad de PLG disponible y que el análogo de lisina ϵ -ACA es capaz de inhibir esta unión en todas las concentraciones de PLG disponibles hasta niveles similares a los del control negativo 1% BSA (Figura 13).

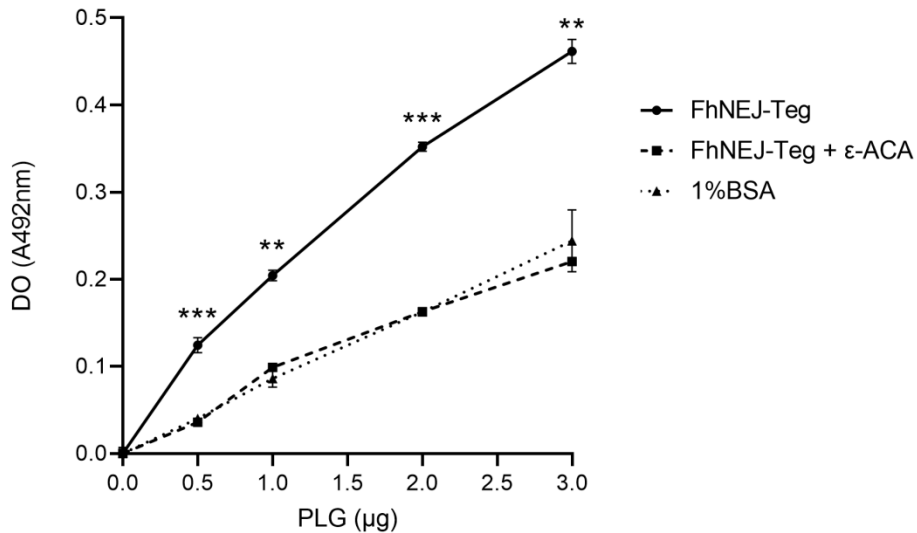


Figura 13. La unión de FhNEJ-Teg a PLG es proporcional a la cantidad de PLG disponible y dependiente de residuos de lisina. La unión se analizó mediante un ensayo ELISA con 0.5 µg de antígeno de extracto de tegumento de juveniles de *F. hepatica* recién excistados (FhNEJ-Teg) en presencia de cantidades crecientes de plasminógeno (PLG) (de 0 a 3 µg) y midiendo la densidad óptica (DO) a 492nm. Un ensayo de competición se llevó a cabo mediante la adición de ácido ε-aminocaproico (ε-ACA) durante la incubación con PLG. 1% BSA sirve como control negativo. Se indica el promedio de dos réplicas ± SD. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre FhNEJ-Teg y el resto de grupos (**p<0.01; ***p<0.001; ANOVA de un factor).

4.3. Discusión y perspectivas futuras

La migración intra-orgánica es un proceso evolutivamente muy conservado en el desarrollo de las fases inmaduras de un gran número de parásitos helmintos en sus hospedadores vertebrados (7). Entre ellos, los vermes juveniles de *F. hepatica*, agente causal de la fasciolosis, llevan a cabo una compleja ruta migratoria que comienza con su excistación en el intestino delgado del hospedador, y los conduce, a través del peritoneo, hasta el tejido hepático. Este proceso implica, entre otras cosas, la secreción parasitaria de un amplio repertorio de proteínas con funciones proteolíticas, con importancia no solo para la migración, sino para la adquisición de nutrientes derivados de la digestión de los tejidos que atraviesa (17); e inmunomoduladoras, que permiten a los vermes regular el sistema inmune de su hospedador a favor de su supervivencia. El proceso de migración de *F. hepatica* termina en los canales biliares intra-hepáticos, que representan un nicho de difícil acceso a la respuesta inmune del hospedador. Por lo tanto, una vez establecido el proceso migratorio en el ciclo biológico del parásito, su eliminación se convierte en una tarea muy intrincada, lo que sugiere que el paso de los FhNEJ a través de la pared intestinal pueda ser considerado como un “punto de no retorno” en el progreso de la fasciolosis. En este sentido, el estudio de los mecanismos moleculares que rigen este proceso podría suponer una estrategia potencialmente efectiva en el control de la fasciolosis. Sin embargo, existen actualmente pocos estudios que aborden estos objetivos y las estrategias de control centradas en el desarrollo de vacunas se han llevado a cabo mayoritariamente con antígenos de vermes adultos con resultados poco esperanzadores (Sección 1.5, Tabla 1).

En general, la comprensión de las relaciones que se establecen entre los parásitos y sus hospedadores es importante para lograr una identificación más racional de estrategias terapéuticas efectivas. Un ejemplo paradigmático de estas relaciones sería la explotación parasitaria de rutas moleculares del hospedador, como por ejemplo el sistema fibrinolítico. La interacción con este sistema facilitaría la supervivencia del parásito dentro de su hospedador de forma más eficiente en términos de gasto energético, lo que estaría en consonancia con el éxito evolutivo de dicha interacción al estar presente de forma muy recurrente en muchos endoparásitos del ser humano (extensamente revisado en la [Sección 3](#)) (8).

Para el estudio experimental aquí presentado se partió de la extracción de los antígenos asociados al tegumento de FhNEJ. Esta estructura representa la interfaz entre *F. hepatica* y el hospedador y es una estructura metabólicamente activa que desarrolla importantes funciones vitales relacionadas con la síntesis y secreción de sustancias, la absorción de nutrientes, la osmorregulación y la protección contra enzimas del hospedador (117). Además, según lo revisado en la [Sección 3.3.1](#), muchos de los parásitos que explotan el sistema fibrinolítico de sus hospedadores lo hacen mediante la expresión de proteínas de unión al PLG en su superficie, lo que repercute positivamente en su capacidad de virulencia y supervivencia ([Tabla 2](#)). Dada la importancia del tegumento en el desarrollo del parásito y su supervivencia dentro del hospedador, un mejor conocimiento de la morfología y composición de este compartimento permitiría desarrollar estrategias de control contra la fasciolosis más efectivas. En relación con esto, el tegumento de *F. hepatica* está constantemente expuesto al sistema inmune del hospedador, de modo que los antígenos derivados de este compartimento representan potenciales candidatos para el desarrollo de vacunas (117). Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran la capacidad del tegumento de los FhNEJ para unir PLG, lo que complementa estudios previos que demuestran que los vermes adultos de este parásito segregan proteínas capaces de ejercer la misma función (9,10). Esta unión, tal y como sucede en la mayoría de proteínas parasitarias capaces de actuar como receptores de PLG ([Sección 3.3.2](#)), es dependiente de residuos de lisina, ya que la incubación del extracto antigénico con PLG junto con el análogo de lisina ϵ -ACA disminuye significativamente la unión entre los dos primeros, hasta niveles similares a los del control negativo.

Estudios futuros que complementen estos resultados incluirían un ensayo de generación de plasmina en el que se determine si el PLG unido a la superficie de los FhNEJ puede ser activado a su forma catalíticamente activa en presencia de los activadores derivados del hospedador [el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA)]. La generación de plasmina en la superficie de los FhNEJ podría proveer a los vermes juveniles de una maquinaria proteolítica de amplio espectro en su superficie que les permita degradar, entre otros componentes, moléculas de la matriz extracelular y llevar a cabo su ruta migratoria hacia la localización definitiva del parásito en las vías biliares. Si la generación de plasmina se confirma, sería de interés identificar las proteínas responsables de esta unión y que, por tanto, podrían actuar como receptores de PLG en el tegumento de los FhNEJ, como se ha llevado a cabo en estudios anteriores con objetivos similares en otros parásitos (85).

Estos estudios podrían incluso completarse con experimentos que permitan establecer si la generación de plasmina en la superficie de los FhNEJ tiene alguna relevancia funcional. Para ello, podría bloquearse la actividad de la proteína en cuestión (con anticuerpos o evitando su expresión mediante técnicas de RNAi o CRISPR) y, a continuación, analizar la capacidad migratoria de los FhNEJ en un modelo *ex vivo* de migración trans-intestinal como el utilizado por McGonigle et al. (118). No obstante, estrategias de edición genética del tipo CRISPR son técnicamente complejas en organismos pluricelulares con múltiples órganos y tejidos como los parásitos helmintos y, de hecho, hasta la fecha solo existen dos artículos muy recientes en los que han sido utilizadas con éxito en trematodos (119,120). Por otra parte, el hecho de que no existiera una disminución en la capacidad migratoria de los FhNEJ tras provocar una expresión reducida de una proteína de unión al PLG, podría deberse a que estos, probablemente y al igual que otros parásitos, expresen múltiples proteínas de unión al PLG con efectos redundantes (84). La mejor manera de determinar si la generación de plasmina alrededor de los FhNEJ es importante en el inicio de su ruta migratoria hacia el hígado sería mediante el uso de ratones deficientes en PLG, en relación con lo publicado por Maldonado et al. (121), quienes demuestran que los amastigotes de *Leishmania mexicana* inoculados a ratones PLG^{-/-} generan lesiones menos extensas y virulentas que las generadas en ratones *wild-type*.

Además de favorecer la migración de los FhNEJ, la generación de plasmina en la superficie de estos podría suponer un potencial mecanismo de evasión de la respuesta inmune a nivel intestinal. Existen estudios que describen la capacidad de catepsinas expresadas por vermes adultos de *F. hepatica* para degradar inmunoglobulinas (42) y receptores importantes en la respuesta inmune innata (43) (Figura 3), pero aún no se ha descrito ninguna actividad proteolítica con funciones relacionadas con la evasión inmune en FhNEJ. Dado que la degradación de anticuerpos opsonizantes por parte de la plasmina unida a la superficie de bacterias es un proceso común (75), la unión de PLG en la superficie de los FhNEJ podría cumplir un rol dual, tanto para la migración e invasión de tejidos como para facilitar la evasión de la respuesta inmune a nivel intestinal.

En contraposición a los beneficios adquiridos por el parásito vinculados con la unión de PLG en su superficie, la sobre-activación del sistema fibrinolítico se ha relacionado con diversas situaciones patológicas como el crecimiento de la placa arterial, la aterosclerosis crónica y síndromes coronarios agudos, entre otras. Los mecanismos patogénicos que conducen a estas patologías incluyen la proliferación y migración celulares, la degradación de la matriz extracelular y la inflamación, y todos ellos han sido relacionados con un aumento en la actividad de la plasmina (65) (Sección 2.2.5). Curiosamente, la patología crónica de la fasciolosis está relacionada con la generación de una respuesta inflamatoria que genera hiperplasia epitelial y dilatación de los conductos y vesícula biliar, lo que puede terminar por causar obstrucciones del sistema biliar (5) (Sección 1.3). Si se confirmara que los FhNEJ son capaces de generar plasmina en su superficie, sería posible que los vermes adultos mantengan esta capacidad (9,10), y que esto estuviera relacionado con los mecanismos moleculares que subyacen a los signos clínicos que aparecen en la fase crónica de la fasciolosis de una forma similar a lo que ocurre en las patologías vasculares mencionadas.

CONCLUSIONES

1. La fasciolosis humana es una enfermedad tropical desatendida cuya importancia sanitaria está en aumento debido a la amplia distribución de su principal agente etiológico, el trematodo *Fasciola hepatica*, así como a la aparición de resistencias al fármaco de elección, el triclabendazol. Además, el desarrollo de nuevas herramientas de control basadas en la vacunación no ha alcanzado los resultados esperados. Estos ensayos han estado principalmente enfocados a las fases adultas del parásito, pese a localizarse estas en un nicho poco accesible al sistema inmune del hospedador (los canales biliares intra-hepáticos). Por ello, el conocimiento de las relaciones parásito/hospedador en la fasciolosis en fases más tempranas de la infección, y en concreto de aquellas desarrolladas por las fases juveniles de *F. hepatica* que migran desde el intestino delgado hasta el tejido hepático del hospedador, sería de gran importancia para el diseño de estrategias de control de la fasciolosis que permitan abordar esta enfermedad de forma más efectiva.
2. El sistema fibrinolítico de los mamíferos es un conjunto de mecanismos finamente regulados encargados de lisar el coágulo de fibrina una vez formado a nivel vascular. Dicha acción es llevada a cabo por la forma activa del plasminógeno y enzima final de la ruta, la plasmina, una proteasa de serina de amplio espectro, cuyas funciones incluyen también procesos de migración celular y respuesta inflamatoria, entre otras.
3. Mediante un claro ejemplo de convergencia evolutiva, un gran número de endoparásitos del ser humano de diferentes grupos filogenéticos han desarrollado mecanismos comunes de interacción con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores, lo que les permite la explotación de la capacidad proteolítica de la plasmina generada. Esto favorecería la capacidad de virulencia (migración e invasión tisular) y supervivencia (disolución de coágulos y evasión de la respuesta inmune) de estos parásitos dentro de su hospedador vertebrado.
4. El principal mecanismo de interacción de los endoparásitos del ser humano con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores es la expresión de proteínas capaces de unir plasminógeno. Estas proteínas tienen normalmente funciones celulares distintas, pero pueden ser relocalizadas a la superficie o segregadas al exterior mediante mecanismos aún desconocidos para llevar a cabo la unión del plasminógeno. Esta unión es generalmente dependiente de la presencia de residuos de lisina en estas proteínas y, salvo excepciones, precisa de la presencia de los activadores fisiológicos (t-PA y u-PA) para que dicha unión genere plasmina.
5. El estudio experimental incluido en este trabajo demuestra que los vermes juveniles de *F. hepatica* recién excistados son capaces de unir PLG en su tegumento, y que esta unión es dependiente de residuos de lisina presentes en las proteínas implicadas en dicha unión. Esta interacción representa un mecanismo parasitario que, potencialmente, podría facilitar tanto la migración intra-orgánica que estos parásitos llevan a cabo durante su desarrollo, como la evasión de la respuesta inmune del hospedador vertebrado, lo que repercutiría positivamente en la virulencia y supervivencia de *F. hepatica* dentro de su hospedador.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hotez PJ, Fenwick A, Sachs SE. Control of Neglected Tropical Diseases. *N Engl J Med*. 2007;357(10):1018–27.
2. WHO (2012) TDR Disease Reference Group on Helminth Infections. Research priorities for helminth infections: Technical report of the TDR Disease Reference Group on helminth infections. Geneva: World Health Organization.
3. Freeman MC, Ogden S, Jacobson J, Abbott D, Addiss DG, Amnie AG, et al. Integration of water, sanitation, and hygiene for the prevention and control of Neglected Tropical Diseases: A rationale for inter-sectoral collaboration. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(9):e2439.
4. WHO (2010) Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization.
5. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Fascioliasis. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1154:71–103.
6. Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW. Current threat of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol*. 2016;32(6):458–69.
7. Mulcahy G, O'Neill S, Fanning J, McCarthy E, Sekiya M. Tissue migration by parasitic helminths: an immunoevasive strategy? *Trends Parasitol*. 2005;21(6):273–7.
8. González-Miguel J, Siles-Lucas M, Kartashev V, Morchón R, Simón F. Plasmin in parasitic chronic infections: Friend or Foe? *Trends Parasitol*. 2016;32(4):325–35.
9. González-Miguel J, Valero MA, Reguera-Gomez M, Mas-Bargues C, Bargues MD, Simón F, et al. Numerous *Fasciola* plasminogen-binding proteins may underlie blood-brain barrier leakage and explain neurological disorder complexity and heterogeneity in the acute and chronic phases of human fascioliasis. *Parasitology*. 2019;146(3):284–98.
10. Bernal D, de la Rubia JE, Carrasco-Abad AM, Toledo R, Mas-Coma S, Marcilla A. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Lett*. 2004;563(1–3):203–6.
11. Keiser J, Utzinger J. Food-borne trematodiasis. *CMR*. 2009;22(3):466–83.
12. Lotfy WM, Brant SV, DeJong RJ, Hoah Le T, Demiaszkiewicz A, Lotfy WM, et al. Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(2):248–55.
13. Dalton JP. Fasciolosis. Wallingford, UK ; New York, USA: CABI Publishing; 1999.
14. Wilson RA, Wright JM, de Castro-Borges W, Parker-Manuel SJ, Dowle AA, Ashton PD, et al. Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *Int J Parasitol*. 2011;41(13–14):1347–59.
15. Hanna REB. *Fasciola hepatica*: Glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp Parasitol*. 1980;50(1):103–14.
16. Toet H, Piedrafita DM, Spithill TW. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int J Parasitol*. 2014;44(12):915–27.
17. Caffrey CR, Goupil L, Rebello KM, Dalton JP, Smith D. Cysteine proteases as digestive enzymes in parasitic helminths. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(8):e0005840.

18. Harrington D, Lamberton PHL, McGregor A. Human liver flukes. *Lancet Gastroenterol.* 2017;2(9):680–9.
19. CDC: *Fasciola* - Biology [Internet]. 2019 [cited 2020 Jul 2]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html>
20. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol.* 2009;69:41–146.
21. CDC: *Fasciola* - Epidemiology & Risk Factors [Internet]. 2019 [cited 2020 Jun 20]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/fasciola/epi.html>
22. WHO (2007) Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. Geneva: World Health Organization.
23. Valero MA, Perez-Crespo I, Periago MV, Khoubbane M, Mas-Coma S. Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Trop.* 2009;111(2):150–9.
24. Martínez-Sernández V, Muiño L, Perteguer MJ, Gárate T, Mezo M, González-Warleta M, et al. Development and evaluation of a new lateral flow immunoassay for serodiagnosis of human fasciolosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(11):e1376.
25. Martínez-Valladares M, Rojo-Vázquez FA. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of fasciolosis in sheep and its application under field conditions. *Parasites Vector.* 2016;9(1):73.
26. Fairweather I, Brennan GP, Hanna REB, Robinson MW, Skuce PJ. Drug resistance in liver flukes. *Int J Parasitol.* 2020;12:39–59.
27. Winkelhagen AJS, Mank T, de Vries PJ, Soetekouw R. Apparent triclabendazole-resistant human *Fasciola hepatica* infection, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(6):1028–9.
28. Nansen P. Resistance in cattle to *Fasciola hepatica* induced by gamma-ray attenuated larvae: results from a controlled field trial. *Res Vet Sci.* 1975;19(3):278–83.
29. Dominguez MF, González-Miguel J, Carmona C, Dalton JP, Cwiklinski K, Tort J, et al. Low allelic diversity in vaccine candidates genes from different locations sustain hope for *Fasciola hepatica* immunization. *Vet Parasitol.* 2018;258:46–52.
30. Azizi H, Mirzaeei H, Nasiri AA, Bazi A, Mirzapour A, Khatami M, et al. Naltrexone as an efficient adjuvant in induction of Th₁ immunity and protection against *Fasciola hepatica* infection. *Exp Parasitol.* 2018;189:66–71.
31. Wesołowska A, Basałaj K, Norbury LJ, Sielicka A, Wędrychowicz H, Zawistowska-Deniziak A. Vaccination against *Fasciola hepatica* using cathepsin L3 and B3 proteases delivered alone or in combination. *Vet Parasitol.* 2018;250:15–21.
32. van Milligen FJ, Cornelissen JB, Bokhout BA. *Fasciola hepatica*: an antigen fraction derived from newly excysted juveniles, containing an immunoreactive 32-kDa protein, induces strong protective immunity in rats. *Exp Parasitol.* 2000;94(3):163–71.

33. Reszka N, Cornelissen JBWJ, Harmsen MM, Bieńkowska-Szewczyk K, de Bree J, Boersma WJ, et al. *Fasciola hepatica* procathepsin L3 protein expressed by a baculovirus recombinant can partly protect rats against fasciolosis. *Vaccine*. 2005;23(23):2987–93.
34. Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PM. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet Parasitol*. 2009;160(3–4):230–6.
35. Wesołowska A, Basałaj K, Norbury LJ, Sielicka A, Wędrychowicz H, Zawistowska-Deniziak A. Sex and vaccination: Insights from female rats vaccinated with juvenile-specific proteases from *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*. 2018;255:91–6.
36. Sandeman RM, Howell MJ, Campbell NJ. An attempt to vaccinate sheep against *Fasciola hepatica* using a juvenile fluke antigen sheep antibody complex. *Res Vet Sci*. 1980;29(2):255–9.
37. Burden DJ, Harness E, Hammet NC. *Fasciola hepatica*: attempts to immunise rats and mice with metabolic and somatic antigens derived from juvenile flukes. *Vet Parasitol*. 1982;9(3–4):261–6.
38. Pfister K, Turner K, Wedrychowicz H. Worm recovery, haemagglutinating antibodies and IgE-levels after immunisation against *Fasciola hepatica* in rats. *Vet Parasitol*. 1985;17(2):139–50.
39. McVeigh P, Maule AG, Dalton JP, Robinson MW. *Fasciola hepatica* virulence-associated cysteine peptidases: a systems biology perspective. *Microb Infect*. 2012;14(4):301–10.
40. Meemon K, Sobhon P. Juvenile-specific cathepsin proteases in *Fasciola* spp.: their characteristics and vaccine efficacies. *Parasitol Res*. 2015;114(8):2807–13.
41. Stack C, Dalton JP, Robinson MW. The phylogeny, structure and function of trematode cysteine proteases, with particular emphasis on the *Fasciola hepatica* cathepsin L family. *Adv Exp Med Biol*. 2011;712:116–135
42. Berasain P, Carmona C, Frangione B, Dalton JP, Goñi F. *Fasciola hepatica*: Parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: Determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Exp Parasitol*. 2000;94(2):99–110.
43. Donnelly S, O'Neill SM, Stack CM, Robinson MW, Turnbull L, Whitchurch C, et al. Helminth cysteine proteases inhibit TRIF-dependent activation of macrophages via degradation of TLR3. *J Biol Chem*. 2010;285(5):3383–92.
44. Mebius MM, Op Heij JMJ, Tielens AGM, de Groot PG, Urbanus RT, van Hellemond JJ. Fibrinogen and fibrin are novel substrates for *Fasciola hepatica* cathepsin L peptidases. *Mol Biochem Parasitol*. 2018;221:10–3.
45. Robinson MW, Dalton JP, O'Brien BA, Donnelly S. *Fasciola hepatica*: The therapeutic potential of a worm secretome. *Int J Parasitol*. 2013;43(3–4):283–91.
46. Dalton JP, Robinson MW, Mulcahy G, O'Neill SM, Donnelly S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet Parasitol*. 2013;195(3–4):272–85.
47. Cwiklinski K, Jewhurst H, McVeigh P, Barbour T, Maule AG, Tort J, et al. Infection by the Hhlminth parasite *Fasciola hepatica* requires rapid regulation of metabolic, virulence, and invasive factors to adjust to its mammalian host. *Mol Cell Proteomics* 2018;17(4):792–809.

48. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(1):327–58.
49. Stassen J, Arnout J, Deckmyn H. The hemostatic system. *CMC.* 2004;11(17):2245–60.
50. Gale AJ. Current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol.* 2011;39(1):273–80.
51. Manon-Jensen T, Kjeld NG, Karsdal MA. Collagen-mediated hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2016;14(3):438–48.
52. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost.* 2009;7(1):4–13.
53. Godier A, Hunt BJ. Plasminogen receptors and their role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune and malignant disease. *J Thromb Haemost.* 2013;11(1):26–34.
54. Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann NY Acad Sci.* 2001;936(1):226–36.
55. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2005;129(3):307–21.
56. Law RHP, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep.* 2012;1(3):185–90.
57. Syrovets T, Simmet Th. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(7–8):873–85.
58. Syrovets T, Lunov O, Simmet T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J Leukoc Biol.* 2012;92(3):509–19.
59. Miles L. Critical role for conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen for optimal stimulation of plasminogen activation on cell surfaces. *Trends Cardiovas Med.* 2003;13(1):21–30.
60. Flick MJ, Bugge TH. Plasminogen-receptor KT: plasminogen activation and beyond. *J Thromb Haemost.* 2017;15(1):150–4.
61. Miles LA, Plow EF, Waisman DM, Parmer RJ. Plasminogen Receptors. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:1–3.
62. Das R, Pluskota E, Plow EF. Plasminogen and its receptors as regulators of cardiovascular inflammatory responses. *Trends Cardiovascul Med.* 2010;20(4):120–4.
63. Plow EF, Doeuvre L, Das R. So many plasminogen receptors: Why? *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:1–6.
64. Lähteenmäki K, Edelman S, Korhonen TK. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol.* 2005;13(2):79–85.
65. Nicholl S, Roztocil E, Davies M. Plasminogen activator system and vascular disease. *CVP.* 2006;4(2):101–16.
66. Bugge, Thomas H., Flick, Matthew J., Danton, Mary Jo S., Daugherty, Cynthia C., Romer, John, Dano, Keld, et al. Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. *PNAS.* 1995;93:5899–904.
67. Schaller J, Gerber SS. The plasmin–antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(5):785–801.

68. Mondino A, Blasi F. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol.* 2004;25(8):6.
69. Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(1):23–36.
70. Meijers J, Herwald H. Protein C Inhibitor. *Semin Thromb Hemost.* 2011;37(04):349–54.
71. Khan MS, Singh P, Azhar A, Naseem A, Rashid Q, Kabir MA, et al. Serpin inhibition mechanism: A delicate balance between native metastable state and polymerization. *J Amino Acids.* 2011;2011:1–10.
72. Strickland DK, Kounnas MZ, Argraves WS. LDL receptor-related protein: a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. *FASEB J.* 1995;9(10):890–8.
73. Herz J, Strickland DK. LRP: A multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* 2001;108(6):779–84.
74. Figuera L, Gómez-Arreaza A, Avilán L. Parasitism in optima forma: Exploiting the host fibrinolytic system for invasion. *Acta Trop.* 2013;128(1):116–23.
75. Crane DD, Warner SL, Bosio CM. A novel role for plasmin-mediated degradation of opsonizing antibody in the evasion of host immunity by virulent, but not attenuated, *Francisella tularensis*. *J Immunol.* 2009;183(7):4593–600.
76. Draxler DF, Medcalf RL. The fibrinolytic system: more than fibrinolysis? *Transfus Med Rev.* 2015;29(2):102–9.
77. Bhattacharya S, Ploplis VA, Castellino FJ. Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:1–19.
78. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, for the PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ.* 2009;339(b2535):1–8.
79. González-Miguel J, Morchón R, Siles-Lucas M, Oleaga A, Simón F. Surface-displayed glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and galectin from *Dirofilaria immitis* enhance the activation of the fibrinolytic system of the host. *Acta Trop.* 2015;145:8–16.
80. González-Miguel J, Morchón R, Carretón E, Montoya-Alonso JA, Simón F. Surface associated antigens of *Dirofilaria immitis* adult worms activate the host fibrinolytic system. *Vet Parasitol.* 2013;196(1–2):235–40.
81. González-Miguel J, Morchón R, Siles-Lucas M, Simón F. Fibrinolysis and proliferative endarteritis: two related processes in chronic infections? The model of the blood-borne pathogen *Dirofilaria immitis*. *PLoS ONE.* 2015;10(4):e0124445.
82. Leontovych A, Ulrychová L, O'Donoghue AJ, Vondrášek J, Marešová L, Hubálek M, et al. SmSP2: A serine protease secreted by the blood fluke pathogen *Schistosoma mansoni* with anti-hemostatic properties. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(4):e0006446.
83. de la Torre-Escudero E, Pérez-Sánchez R, Manzano-Román R, Oleaga A. *Schistosoma bovis*-host interplay: Proteomics for knowing and acting. *Mol Biochem Parasitol.* 2017;215:30–9.
84. Figueiredo BC, Da'dara AA, Oliveira SC, Skelly PJ. Schistosomes enhance plasminogen activation: the role of tegumental enolase. *PLoS Pathog.* 2015;11(12):e1005335.

85. González-Miguel J, Morchón R, Mellado I, Carretón E, Montoya-Alonso JA, Simón F. Excretory/secretory antigens from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. *Mol Biochem Parasitol.* 2012;181(2):134–40.
86. González-Miguel J, Morchón R, Carretón E, Montoya-Alonso JA, Simón F. Can the activation of plasminogen/plasmin system of the host by metabolic products of *Dirofilaria immitis* participate in heartworm disease endarteritis? *Parasites Vector.* 2015;8(194):1–9.
87. Melo PMS, Bagnaresi P, Paschoalin T, Hirata IY, Gazarini ML, Carmona AK. *Plasmodium falciparum* proteases hydrolyze plasminogen, generating angiotatin-like fragments. *Mol Biochem Parasitol.* 2014;193(1):45–54.
88. Diosdado A, Simón F, Morchón R, González-Miguel J. Pro-fibrinolytic potential of the third larval stage of *Ascaris suum* as a possible mechanism facilitating its migration through the host tissues. *Parasites Vector.* 2020;13(1):203.
89. He L, Ren M, Chen X, Wang X, Li S, Lin J, et al. Biochemical and immunological characterization of annexin B30 from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products. *Parasitol Res.* 2014;113(7):2743–55.
90. Aguayo-Ortiz R, Meza-Cervantez P, Castillo R, Hernández-Campos A, Dominguez L, Yépez-Mulia L. Insights into the *Giardia intestinalis* enolase and human plasminogen interaction. *Mol Biosyst.* 2017;13(10):2015–23.
91. Figuera L, Acosta H, Gómez-Arreaza A, Dávila-Vera D, Balza-Quintero A, Quiñones W, et al. Plasminogen binding proteins in secreted membrane vesicles of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 2013;187(1):14–20.
92. Ghosh AK, Coppens I, Gårdsvoll H, Ploug M, Jacobs-Lorena M. *Plasmodium* ookinetes co-opt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *PNAS.* 2011;108(41):17153–8.
93. Jiang P, Zao YJ, Yan SW, Song YY, Yang DM, Dai LY, et al. Molecular characterization of a *Trichinella spiralis* enolase and its interaction with the host's plasminogen. *Vet Res.* 2019;50(1):106.
94. Liu X, Zheng C, Gao X, Chen J, Zheng K. Complete molecular and immunoprotective characterization of *Babesia microti* enolase. *Front Microbiol.* 2017;8(622):1–11.
95. Mi R, Yang X, Huang Y, Cheng L, Lu K, Han X, et al. Immunolocation and enzyme activity analysis of *Cryptosporidium parvum* enolase. *Parasites Vector.* 2017;10(1):273.
96. Wang X, Chen W, Hu F, Deng C, Zhou C, Lv X, et al. *Clonorchis sinensis* enolase: Identification and biochemical characterization of a glycolytic enzyme from excretory/secretory products. *Mol Biochem Parasitol.* 2011;177(2):135–42.
97. Yang J, Qiu C, Xia Y, Yao L, Fu Z, Yuan C, et al. Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase which is highly expressed at the schistosomulum stage. *Parasitol Res.* 2010;107(3):667–77.
98. Ayón-Núñez DA, Fragoso G, Bobes RJ, Lacleite JP. Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases. *Biosci Rep.* 2018;38(5):1–16.

99. Mirasol-Meléndez E, Brieba LG, Díaz-Quezada C, López-Hidalgo M, Figueroa-Angulo EE, Ávila-González L, et al. Characterization of multiple enolase genes from *Trichomonas vaginalis*. Potential novel targets for drug and vaccine design. *Parasitol Int.* 2018;67(4):444–53.
100. Yang Y, Bai X, Li C, Tong M, Zhang P, Cai W, et al. Molecular characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Trichinella spiralis* and its potential in inducing immune protection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(122):1–11.
101. Hu Y, Zhang E, Huang L, Li W, Liang P, Wang X, et al. Expression profiles of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Clonorchis sinensis*: a glycolytic enzyme with plasminogen binding capacity. *Parasitol Res.* 2014;113(12):4543–53.
102. Liu X, Li H, Deng H, Zheng C, Yan H, Chen Z, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Babesia microti* is a plasminogen- and actin-binding protein. *Front Vet Sci.* 2019;6(228):1–8.
103. Pirovich DB, Da'dara AA, Skelly PJ. *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances formation of the blood-clot lysis protein plasmin. *Biol Open.* 2020;9(3):1–10.
104. Gómez-Arreaza A, Acosta H, Barros-Álvarez X, Concepción JL, Albericio F, Avilan L. *Leishmania mexicana* LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated C-kinase) is a plasminogen binding protein. *Exp Parasitol.* 2011;127(4):752–61.
105. Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, Medzihradzky KF, Craik CS, Kelly BL, et al. The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem.* 2011;286(1):429–40.
106. Fernandes RS, Fernandes LGV, de Godoy AS, Miyasato PA, Nakano E, Farias LP, et al. *Schistosoma mansoni* venom allergen-like protein 18 (SmVAL18) is a plasminogen-binding protein secreted during the early stages of mammalian-host infection. *Mol Biochem Parasitol.* 2018;221:23–31.
107. González-Miguel J, Larrazabal C, Loa-Mesón D, Siles-Lucas M, Simón F, Morchón R. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and galectin from *Dirofilaria immitis* participate in heartworm disease endarteritis via plasminogen/plasmin system. *Vet Parasitol.* 2016;223:96–101.
108. Mundodi V, Kucknoor AS, Alderete JF. Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated α -enolase of *Trichomonas vaginalis*. *IAI.* 2008;76(2):523–31.
109. Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(Suppl 1):85–90.
110. Miranda-Ozuna JFT, Hernández-García MS, Brieba LG, Benítez-Cardoza CG, Ortega-López J, González-Robles A, et al. The glycolytic enzyme triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* is a surface-associated protein induced by glucose that functions as a laminin- and fibronectin-binding protein. *Infect Immun.* 2016;84(10):2878–94.
111. Monoyios A, Hummel K, Nöbauer K, Patzl M, Schlosser S, Hess M, et al. An alliance of gel-based and gel-free proteomic techniques displays substantial insight into the proteome of a

- virulent and an attenuated *Histomonas meleagridis* strain. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8(407):1–23.
112. Acosta H, Rondón-Mercado R, Avilán L, Concepción JL. Interaction of *Trypanosoma evansi* with the plasminogen-plasmin system. *Vet Parasitol.* 2016;226:189–97.
 113. Wang S, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ, Jacobs-Lorena M. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *PNAS.* 2012;109(31):12734–9.
 114. Schuindt SHS, Oliveira BC de L, Pimentel PM de O, Resende TL, Retamal CA, DaMatta RA, et al. Secretion of multi-protein migratory complex induced by *Toxoplasma gondii* infection in macrophages involves the uPA/uPAR activation system. *Vet Parasitol.* 2012;186(3–4):207–15.
 115. Diosdado A, Gómez PJ, Morchón R, Simón F, González-Miguel J. Interaction between *Wolbachia* and the fibrinolytic system as a possible pathological mechanism in cardiopulmonary dirofilariosis. *Vet Parasitol.* 2017;247:64–9.
 116. González-Miguel J, Becerro-Recio D, Sotillo J, Simón F, Siles-Lucas M. Set up of an *in vitro* model to study early host-parasite interactions between newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica* and host intestinal cells using a quantitative proteomics approach. *Vet Parasitol.* 2020;278:109028.
 117. Ravidà A, Cwiklinski K, Aldridge AM, Clarke P, Thompson R, Gerlach JQ, et al. *Fasciola hepatica* surface tegument: glycoproteins at the interface of parasite and host. *Mol Cell Proteomics.* 2016;15(10):3139–53.
 118. Mcgonigle L, Mousley A, Marks N, Brennan G, Dalton J, Spithill T, et al. The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int J Parasitol.* 2008;38(2):149–55.
 119. Arunsan P, Ittiprasert W, Smout MJ, Cochran CJ, Mann VH, Chaiyadet S, et al. Programmed knockout mutation of liver fluke granulin attenuates virulence of infection-induced hepatobiliary morbidity. *eLife.* 2019;8:e41463.
 120. Ittiprasert W, Mann VH, Karinshak SE, Coghlan A, Rinaldi G, Sankaranarayanan G, et al. Programmed genome editing of the omega-1 ribonuclease of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *eLife.* 2019;8:e41337.
 121. Maldonado J, Marina C, Puig J, Maizo Z, Avilan L. A study of cutaneous lesions caused by *Leishmania mexicana* in plasminogen-deficient mice. *Exp Mol Pathol.* 2006;80(3):289–94.