

TESIS DOCTORAL

Interacción entre los helmintos parásitos y
el sistema hemostático de sus hospedadores.

La larva infectiva de *Ascaris suum*
como modelo experimental



VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Alicia Diosdado Martín

Salamanca, 2023



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOPATOLOGÍA Y
FARMACOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,
ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**

TESIS DOCTORAL

Interacción entre los helmintos parásitos y
el sistema hemostático de sus hospedadores.
La larva infectiva de *Ascaris suum*
como modelo experimental

Tesis Doctoral presentada por **Alicia Diosdado Martín** para optar al Grado de Doctor
por la Universidad de Salamanca.

Fdo.: Alicia Diosdado Martín

Salamanca, 2023

Fernando Simón Martín, Catedrático de Parasitología de la Universidad de Salamanca, y **Javier González Miguel**, Investigador contratado «Ramón y Cajal» en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC),

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada «**Interacción entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores. La larva infectiva de *Ascaris suum* como modelo experimental**» ha sido realizada bajo su dirección por **Alicia Diosdado Martín**, Graduada en Biología y Máster Universitario en Fisiopatología y Farmacología Celular y Molecular por la Universidad de Salamanca, en el Área de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca, y reúne las condiciones necesarias para ser depositada y defendida ante el Tribunal correspondiente para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

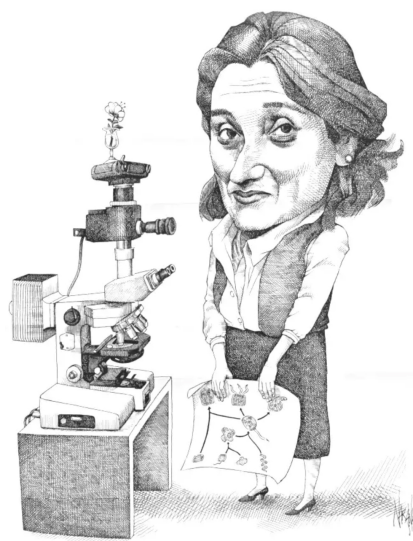
Y para que así conste a los efectos legales, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a 8 de mayo de 2023.

Fdo.: Fernando Simón Martín

Fdo.: Javier González Miguel

Alicia Diosdado Martín ha sido beneficiaria de una ayuda destinada a financiar contratos predoctorales de la Universidad de Salamanca, cofinanciada por el Banco Santander.

Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) y sus resultados han sido publicados en acceso abierto y difundidos en congresos de la especialidad gracias a diferentes convocatorias de la Universidad de Salamanca destinadas a tal fin, al proyecto «CLU-2019-05 – Unidad de Excelencia IRNASA-CSIC», financiado por la Junta de Castilla y León y cofinanciado por la Unión Europea (FEDER «Europa impulsa nuestro crecimiento») y al programa para el apoyo a la internacionalización de las estructuras de investigación de excelencia, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.



«Siempre estamos ligados de una u otra manera al resto»

Lynn Margulis

Esta tesis está dedicada ...

A Fernando, director de la misma,

por dejarme formar parte de su equipo y darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral. Por permitirme así descubrir este bonito mundo de la ciencia y la investigación. Por despertar en mí el interés y la pasión por la parasitología. Por dejarme disfrutar de su experiencia y de esa visión filosófica de la ciencia y de la vida. Por guiarme y asesorarme durante todos estos años. Por su confianza, cariño y comprensión constantes.

A Javier, codirector de la misma,

por constituir un referente en el que mirarse. Por las enseñanzas metodológicas y escriturales. Por la ayuda brindada desde cualquier parte del mundo. Por todas esas conversaciones científicas que, de una u otra forma, hoy se ven reflejadas aquí.

A mi familia.

A mis amigos.

A todas esas personas que han contribuido a su desarrollo.

... y, de forma muy especial, ...

A mis padres, José y Flor,

por proporcionarme una inmejorable educación. Por inculcarme valores tan importantes como la honradez, el respeto o la responsabilidad. Por enseñarme que los objetivos se consiguen con esfuerzo y perseverancia. Por dejarme siempre elegir con libertad y apoyarme en todas mis decisiones. Por darme todo sin esperar nada a cambio. Por su amor incondicional.

A mi hermana, Marta,

por ser mi mejor confidente, la llave de la caja fuerte de mis secretos, mi mitad. Por estar siempre a mi lado. Por adorarme. Por estar siempre dispuesta a escucharme y aconsejarme, a ayudarme y apoyarme, algo que en los últimos años se ha visto duplicado gracias a David.

Y a ti,

por tu paciencia y tu comprensión. Por tu apoyo y dedicación. Por tu ayuda y tus consejos. Por tu cariño y amor. Por cuidarme. Por enriquecerme personal y profesionalmente. Por querer formar parte de mi vida, por dejarme formar parte de la tuya. Por ser como eres, por pensar como piensas. Por hacer esto posible.

íNDiCE

INTRODUCCIÓN	21
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	25
1. Los helmintos parásitos	27
2. <i>A. suum</i> y la ascariosis porcina	30
2.1. Sistemática y filogenia de <i>A. suum</i>	30
2.2. Biología de <i>A. suum</i>	31
2.2.1. La muda	31
2.2.2. Ciclo biológico	32
2.2.3. Morfología y estructura de los vermes adultos	34
2.2.4. Características de los huevos	36
2.2.5. La larva de tercer estadio	38
2.3. Epidemiología de la ascariosis porcina	40
2.4. Patología de la ascariosis porcina	42
2.4.1. Daños producidos por la migración de las larvas	42
2.4.1.1. Daños en el hígado	42
2.4.1.2. Daños en los pulmones	44
2.4.2. Alteraciones asociadas a los vermes adultos	45
2.5. Mecanismos celulares y moleculares de las relaciones parásito-hospedador en la ascariosis porcina	46
2.5.1. Mecanismos de invasión y migración parasitaria	46
2.5.2. Respuesta inmune del hospedador	46
2.5.2.1. Respuesta inmune en una primera infección	46
2.5.2.2. Respuesta inmune en reinfecciones	48
2.5.3. Modulación y evasión del sistema inmune del hospedador por parte del parásito	49
2.5.4. Mecanismos patogénicos	51
2.6. Diagnóstico de la ascariosis porcina	51
2.6.1. Observación de vermes en las heces o el intestino delgado	51
2.6.2. Análisis coprológicos	52
2.6.3. Observación de lesiones en el hígado o los pulmones	52
2.6.4. Técnicas serológicas	53

2.7. Control de la ascariosis porcina	54
2.7.1. Tratamiento farmacológico	54
2.7.2. Estrategias de control alternativas al tratamiento farmacológico	56
2.7.2.1. Vacunación	56
2.7.2.2. Control biológico	57
2.7.3. Prácticas de manejo en las granjas	58
2.8. Implicación sanitaria y económica de la ascariosis porcina	59
2.9. <i>A. lumbricoides</i> versus <i>A. suum</i>	61
3. El sistema hemostático	64
3.1. El sistema de la coagulación	65
3.1.1. La hemostasia primaria	66
3.1.1.1. El factor de von Willebrand	66
3.1.1.2. Las plaquetas	67
3.1.1.3. Inhibidores de la hemostasia primaria	67
3.1.2. La hemostasia secundaria: la cascada de la coagulación	69
3.1.2.1. Los factores de la coagulación	71
3.1.2.1.1. El factor tisular	71
3.1.2.1.2. Los factores de tipo serina-proteasa	71
3.1.2.1.3. Otros factores	72
3.1.2.2. Inhibidores de la cascada de la coagulación	73
3.1.2.2.1. El inhibidor de la ruta del factor tisular	73
3.1.2.2.2. La antitrombina III	74
3.1.2.2.3. La proteína C activada	74
3.2. El sistema fibrinolítico	75
3.2.1. El plasminógeno y la plasmina	75
3.2.2. Activadores del plasminógeno	76
3.2.2.1. El activador tisular del plasminógeno	76
3.2.2.2. El activador del plasminógeno de tipo uroquinasa	77
3.2.3. Inhibidores de la fibrinólisis	79
3.2.3.1. Los inhibidores de los activadores del plasminógeno	79
3.2.3.2. La α_2 -antiplasmina	79

3.2.3.3. El inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina	80
3.2.4. Receptores del plasminógeno. Otras funciones de la plasmina	80
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	83
MATERIALES Y MÉTODOS	87
1. Revisión de alcance sobre la interacción molecular entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados	89
1.1. La revisión de alcance	89
1.2. Protocolo y criterios de elegibilidad	89
1.3. Búsqueda de literatura y selección de las fuentes de evidencia	90
1.4. Registro y análisis de los datos	91
2. Estudio de la interacción entre la larva de tercer estadio de <i>Ascaris suum</i> y el sistema hemostático de su hospedador	91
2.1. Obtención del material biológico	91
2.1.1. Obtención de las larvas de tercer estadio de <i>A. suum</i>	91
2.1.2. Obtención de los extractos de proteínas de la superficie y de los productos excretores/secretores de las larvas de tercer estadio de <i>A. suum</i>	93
2.1.2.1. Obtención del extracto de superficie de las L3As	93
2.1.2.2. Obtención del extracto excretor/secretor de las L3As	94
2.1.3. Obtención de plasma de cerdo	94
2.2. Ensayos anticoagulantes	95
2.3. Ensayo de inhibición del FXa	95
2.4. Ensayos de unión al plasminógeno	96
2.4.1. Ensayo de unión al plasminógeno por ELISA	96
2.4.2. Ensayo de unión al plasminógeno por <i>Western blot</i>	97
2.4.2.1. Electroforesis SDS-PAGE	97
2.4.2.2. Transferencia y <i>Western blot</i>	98
2.4.2.3. Tinción	99
2.4.2.4. Obtención y análisis de imágenes	99
2.4.3. Ensayo de unión al plasminógeno por inmunofluorescencia	99
2.5. Ensayo de activación del plasminógeno	100

2.6. Caracterización e identificación de las proteínas responsables de la inhibición del FXa y de la unión del plasminógeno	101
2.6.1. Electroforesis SDS-PAGE para la caracterización de las proteínas con potencial para inhibir el FXa	101
2.6.2. Electroforesis bidimensional y <i>Western blot</i> para la caracterización de las proteínas con potencial para unir plasminógeno	102
2.6.2.1. Rehidratación de las tiras IPG	102
2.6.2.2. Separación de las proteínas en una primera dimensión	102
2.6.2.3. Equilibrado de las tiras IPG	103
2.6.2.4. Separación de las proteínas en una segunda dimensión	103
2.6.2.5. Tinción y <i>Western blot</i>	104
2.6.3. Identificación de proteínas por espectrometría de masas	104
2.6.4. Análisis bioinformáticos	106
2.7. Análisis estadísticos	107
RESULTADOS	109
1. Revisión de alcance sobre la interacción molecular entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados	111
1.1. Consideraciones generales	111
1.2. Características de la interacción parásito-hospedador	113
1.2.1. Efecto sobre la formación o disolución de coágulos sanguíneos y proceso biológico atribuidos a la interacción	115
1.3. Información biológica y molecular de los parásitos	116
1.3.1. Especie de parásito	116
1.3.2. Estadio del parásito y material parasitario	119
1.3.3. Moléculas parasitarias	120
1.4. Técnicas	121
2. Estudio de la interacción entre la larva de tercer estadio de <i>Ascaris suum</i> y el sistema hemostático de su hospedador	122
2.1. Obtención del material parasitario	123
2.2. L3AsS y L3AsES poseen actividad anticoagulante	124
2.3. L3AsS y L3AsES inhiben el FXa	126

2.4. Caracterización e identificación de las proteínas que inhiben el FXa en L3AsS y L3AsES	126
2.5. L3AsS y L3AsES unen plasminógeno	130
2.6. Unión del plasminógeno a la superficie de las L3As	131
2.7. L3AsS y L3AsES activan el plasminógeno y promueven la generación de plasmina	132
2.8. Caracterización e identificación de las proteínas que unen plasminógeno en L3AsS y L3AsES	133
DISCUSIÓN	137
CONCLUSIONES	153
BIBLIOGRAFÍA	157
ANEXOS	183
Anexo I	185
Anexo II	197
Anexo III	199
Anexo IV	201
Anexo V	207
Anexo VI	209
Anexo VII	213
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS	219
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	225

INTRODUCCIÓN

Las especies del reino animal llevan coexistiendo y conviviendo miles de años. Como consecuencia, entre ellas han surgido interacciones biológicas como el parasitismo, en la que la especie parásita depende metabólicamente de la especie hospedadora, a la cual puede causar un daño. Como resultado de los procesos de coevolución, las relaciones parásito-hospedador que surgen de la lucha por la supervivencia entre ambas especies están finamente reguladas y equilibradas. Esto se traduce en una elevada adaptación entre ambos organismos, la cual se hace patente en las sofisticadas estrategias que permiten a los parásitos explotar, manipular y modular los recursos fisiológicos de sus hospedadores. Como ejemplo paradigmático de este tipo de estrategias nos encontramos con aquellas por las que determinados parásitos sanguíneos o tisulares interaccionan con el sistema hemostático de sus hospedadores, el mecanismo fisiológico que mantiene la correcta fluidez de la sangre. Así, la manipulación de este sistema proporcionaría a estos parásitos, *a priori*, beneficios en términos de establecimiento y supervivencia en el hospedador.

En la actualidad, los parásitos suponen un importante problema médico, veterinario y económico de alcance mundial. Además, en las próximas décadas, tanto la expansión geográfica como la capacidad para infectar nuevos hospedadores podría verse favorecida en algunos parásitos por el cambio climático en el que estamos inmersos, las continuas modificaciones que ejercemos sobre el medio y el manejo que hacemos de los animales que nos rodean. Pese a que en España las enfermedades parasitarias no presentan elevadas tasas de morbilidad en humanos debido, principalmente, a sus condiciones climáticas, socioeconómicas y sanitarias, sí existe, al igual que en el resto del mundo, un problema veterinario y económico asociado a este tipo de afecciones. Entre ellas podemos destacar aquellas que afectan directamente al sector porcino, una de las industrias de importancia capital en nuestro país al suponer en torno al 16 % de la producción final agraria y cerca del 43 % de la producción final ganadera. Gran parte de las pérdidas económicas que se producen en este sector se deben a las infecciones producidas por helmintos parásitos, entre los que *Ascaris suum* es el más prevalente a nivel global. Además, este parásito ha demostrado tener potencial zoonótico y muestra gran proximidad biológica y genética con *A. lumbricoides*, especie parásita del ser humano responsable de más de 800 millones de casos en todo el mundo, lo que también le otorga una indudable importancia médica.

Aunque se dispone de fármacos antihelmínticos que previenen y mitigan los efectos que estos parásitos tienen sobre sus hospedadores, existe una necesidad urgente

de crear alternativas de control debido a los inconvenientes que estos presentan en relación con la aparición de resistencias y la contaminación farmacológica. Una de estas alternativas podría ser la vacunación. Para poder diseñar estrategias vacunales de manera racional, en los últimos años se ha puesto de relieve la importancia del estudio de las relaciones parásito-hospedador, principalmente desde un punto de vista molecular y en fases tempranas de la infección. Con el fin de contribuir a la generación de conocimiento en este tipo de interacciones, la presente Tesis Doctoral se ha focalizado en investigar la capacidad que los helmintos parásitos tienen para modular las acciones del sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados, mediante la revisión sistemática de este campo del conocimiento y el estudio experimental de la manipulación que la larva infectiva de *A. suum* lleva a cabo de dicho sistema del hospedador.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Los helmintos parásitos

Los helmintos parásitos son invertebrados vermiformes que evolucionaron de ancestros de vida libre hace miles de años (1,2). En su transición hacia el modo de vida parasitario, tuvieron que desarrollar ciertas adaptaciones, entre las que se encuentran las complejas, precisas y reguladas estrategias que poseen para afrontar y evadir las respuestas de sus hospedadores, adaptar los mecanismos fisiológicos de estos a sus propias necesidades o modificar su comportamiento, apariencia o fisiología en beneficio propio (2,3). Tomando en consideración los organismos de mayor importancia médica y/o veterinaria, encontramos helmintos parásitos pertenecientes a dos filos diferentes dentro del subreino Metazoa: los nematodos (filo Nematoda) y los platelmintos (filo Platyhelminthes), estos últimos divididos a su vez en trematodos y cestodos (clase Trematoda y clase Cestoidea, respectivamente) (4) (Figura 1). Sin embargo, aunque nematodos y platelmintos divergieron evolutivamente hace millones de años, los patrones de transmisión, infección y patogénesis de sus formas parásitas son similares (5).

Los helmintos constituyen uno de los grupos más comunes entre los agentes infecciosos, tanto de humanos como de animales, afectando las enfermedades que causan a cerca de un cuarto de la población mundial. Pese a que muchos de los helmintos parásitos tienen una distribución global, la población afectada reside, principalmente, en regiones en vías de desarrollo en áreas tropicales y subtropicales de África, América y Asia (6). Además, algunas de estas parasitosis constituyen un riesgo durante el embarazo y el parto y muestran mayor prevalencia e intensidad en niños y adolescentes, los cuales pueden sufrir alteraciones en su desarrollo físico y cognitivo (7). Asimismo, es común que los hospedadores estén coinfectados por múltiples especies de helmintos parásitos e incluso que estos organismos coexistan con otros patógenos (7,8). Cuando esto último ocurre, la respuesta inmune del hospedador frente a dichos patógenos puede verse alterada debido a la capacidad inmunomoduladora que poseen los helmintos, pudiendo empeorar el pronóstico de la enfermedad concomitante (9,10). Por todo ello, estas parasitosis tienen graves consecuencias sanitarias, sociales y económicas, pues no solo presentan elevadas cifras de morbilidad y discapacidad, sino que también generan exclusión social como consecuencia del menor rendimiento socioeconómico y educacional de las personas afectadas (6).

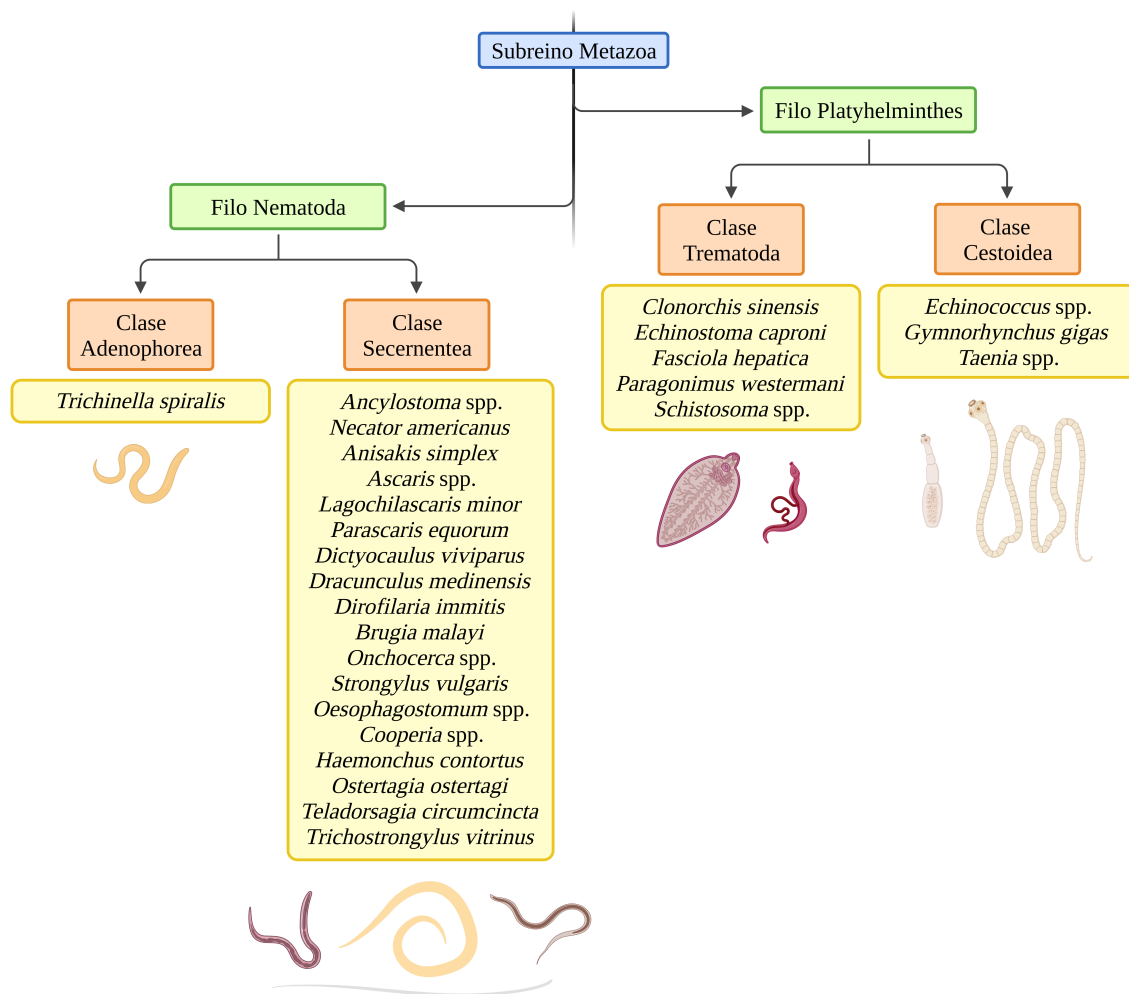


Figura 1. Clasificación taxonómica de los helmintos parásitos citados en la presente Tesis Doctoral. Representación esquemática de los dos filos del subreino Metazoa que albergan dichos helmintos parásitos: el filo Platyhelminthes (vermes de cuerpo plano), que comprende las clases Trematoda (vermes de cuerpo no segmentado) y Cestoidea (vermes de cuerpo segmentado), y el filo Nematoda (vermes de cuerpo redondo), que engloba las clases Adenophorea y Secernentea (4). Figura creada con BioRender.com.

Las helmintiasis también representan más de la mitad del total de enfermedades presentes en las granjas. Tienen un impacto negativo sobre el bienestar y el rendimiento de los animales parasitados, lo que supone importantes pérdidas económicas para la industria ganadera en todo el mundo (11). Los animales domésticos que no están orientados a la ganadería y los animales silvestres también albergan numerosas especies de helmintos parásitos (12). Tanto animales domésticos como silvestres actúan como reservorios de este tipo de parásitos, los cuales pueden ser transmitidos a otros animales o al ser humano, pues muchas de las helmintiasis son zoonosis (6,12,13). El poliparasitismo y las coinfecciones también son comunes en los animales (8).

La epidemiología de las helmintiasis es compleja. Por lo general, los parásitos que las producen presentan ciclos biológicos en los que están implicados varios hospedadores,

algunos de los cuales también actúan como vectores. Asimismo, las condiciones climáticas y ambientales y factores culturales, educacionales y socioeconómicos son determinantes en su distribución. Todo ello dificulta en gran medida su control (6), que recae, tanto en humanos como en animales, sobre el tratamiento farmacológico con antihelmínticos (7,14). No obstante, dicha aproximación no evita las reinfecciones (5,15) y, además, el uso masivo e incorrecto de estos medicamentos durante décadas, junto con factores genéticos y biológicos, ha desencadenado la selección de genes de resistencia en diversas especies (p. ej. *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Fasciola hepatica*, *Strongylus vulgaris*, *Parascaris equorum* y *Oesophagostomum* spp.). Este hecho ha sido descrito tanto en el ser humano como en distintas especies de animales (ovejas, cabras, vacas, caballos y cerdos), en todos los continentes habitados permanentemente (África, América, Asia, Europa y Oceanía) y en los principales grupos de antihelmínticos empleados en la actualidad (benzimidazoles, lactonas macrocíclicas y agonistas colinérgicos) (14,16-19). Además, estudios genéticos recientes han señalado la potencialidad de otras especies parásitas de humanos, como *Ascaris lumbricoides*, para mostrar resistencia a antihelmínticos en el futuro (20).

Este escenario es aún más alarmante si se tiene en cuenta la potencial expansión geográfica de los helmintos parásitos como consecuencia del cambio climático (p. ej. condiciones de humedad y temperatura favorables para su desarrollo y transmisión en más partes del mundo), la modificación del hábitat, la interacción entre humanos y animales o el manejo (p. ej. proliferación de granjas ecológicas) y transporte (p. ej. introducción de parásitos y vectores en lugares en los que no existían previamente) que se hace de estos últimos (21-23). Esto, sumado a las elevadas prevalencias y las graves consecuencias de las helmintiasis, su difícil control y la manifestación de resistencia a antihelmínticos, sugieren la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico, tratamiento y, especialmente, prevención, como la vacunación (7,24). A diferencia de los antihelmínticos, las vacunas proporcionan una protección duradera frente a las reinfecciones y no generan residuos químicos que puedan permanecer en el medio ambiente o en los productos derivados de los animales, por lo que se consideran una alternativa favorable desde el punto de vista sanitario y compatible con las buenas prácticas ecológicas (24).

Aunque durante décadas se ha progresado en el desarrollo de vacunas contra los helmintos parásitos, en la actualidad solamente se comercializan tres para su uso en

animales (contra *Dictyocaulus viviparus* en ganado bovino, contra *H. contortus* en ovino y contra *Echinococcus granulosus* en ovino y caprino) (24) y ninguna está aprobada para su uso en humanos (15). Entre las causas de esta ausencia se encuentran la diversidad y complejidad de los helmintos parásitos, ya que son organismos eucariotas pluricelulares que presentan ciclos biológicos complejos con diferentes estadios (cada uno de los cuales exhibe componentes antigénicos específicos) y tienen capacidad para modular y evadir el sistema inmune de sus hospedadores (5,15). A ello hay que añadir la falta de conocimiento de las interacciones parásito-hospedador (25). Esto se debe, al menos en parte, a que las helmintiasis han sido históricamente relegadas en las políticas de salud mundial, de manera que la financiación que se ha recibido para su estudio ha sido escasa (5-7). En efecto, de las veinte enfermedades tropicales desatendidas designadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), ocho (el 40 %) son causadas por helmintos parásitos (6).

Finalmente, para que los fármacos y vacunas resulten efectivos, estos deben estar acompañados de otras medidas, como la educación de la población o la mejora de los sistemas de potabilización de agua, saneamiento e higiene, deficientes en regiones empobrecidas y en muchas granjas. La importancia de estas medidas se refleja en el hecho de que la única helmintiasis que está a punto de ser erradicada (la dracunculosis humana, producida por *Dracunculus medinensis*) ha alcanzado esta condición gracias, únicamente, a la implementación de estas y otras estrategias de control, pues no existe ningún fármaco ni vacuna para su tratamiento y prevención (6).

2. *A. suum* y la ascariosis porcina

2.1. Sistemática y filogenia de *A. suum*

A. suum Goeze, 1782, especie causante de la ascariosis porcina, pertenece al género *Ascaris*, incluido en la familia Ascarididae, superfamilia Ascaridoidea, orden Ascaridida, clase Secernentea, filo Nematoda, subreino Metazoa, reino Animalia, dominio Eukarya. Dentro de este mismo género se encuentra la especie *A. lumbricoides* Linnaeus, 1758, responsable de la ascariosis humana (4).

Pese a los miles de años de coexistencia y coevolución entre las especies de *Ascaris* y sus hospedadores, todavía hoy se desconoce el origen, evolución, divergencia

y dispersión de los integrantes de este género de parásitos, pues los estudios paleoparasitológicos y moleculares llevados a cabo con el objetivo de aclarar dichos fenómenos no han sido concluyentes (26,27). Se ha postulado que *A. suum* y *A. lumbricoides* habrían surgido a partir de un ancestro común que se originó en un hospedador (cerdo o humano) y, posteriormente, dio lugar a dos especies diferentes tras sufrir uno o varios procesos de colonización de diversos hospedadores y separación geográfica de sus poblaciones (27-29). Actualmente, se acepta que el hospedador en el que habría surgido *Ascaris* sería el humano, ya que se han encontrado huevos de este parásito en muestras humanas en Francia y América que datan de periodos previos a la domesticación (30000-25000 a. C.) y a la introducción del cerdo en el continente americano, respectivamente (30,31). También se han hallado huevos de *A. lumbricoides*, datados en épocas más recientes, en coprolitos humanos de Perú (2277 a. C.), en momias egipcias (1938-1600 a. C.) y en letrinas de campamentos romanos del siglo I a. C. (32-34). Además de los datos paleontológicos, análisis genéticos recientes sugieren que *A. lumbricoides* es más primitivo que *A. suum*, por lo que habría que considerar al primero ancestro del segundo (35).

2.2. Biología de *A. suum*

A. suum es un parásito interno, principalmente de suidos como el jabalí (*Sus scrofa*) y el cerdo doméstico (*S. s. domesticus*), los cuales actúan como hospedadores definitivos. No obstante, no es específico de este grupo de vertebrados, pues se han denunciado infecciones naturales por dicho parásito en ganado ovino, caprino y bovino, así como en chimpancés y perros (36-41). Además, existen casos de ascariosis humana que han sido atribuidos a infecciones producidas por *Ascaris* derivados del cerdo, por lo que la ascariosis porcina es considerada una enfermedad zoonótica (42-45).

2.2.1. La muda

Durante su desarrollo, *A. suum* pasa por cuatro fases larvarias (tres de las cuales se forman dentro del huevo) y la adulta. El paso de unos estadios a otros se produce a través de mudas, proceso que consiste en la síntesis de una nueva cutícula y la eliminación de la antigua, permitiendo el crecimiento del verme. La cutícula resultante de cada uno de los cuatro procesos de muda posee una morfología y composición diferentes. El cambio de cutícula puede producirse por reabsorción o tras la salida del verme de la

cutícula antigua como consecuencia de la acción de diversas enzimas, y en ambos casos la nueva cutícula es segregada por la hipodermis (46).

2.2.2. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *A. suum* es de tipo monoxeno, ya que solo requiere un hospedador para completarse, produciéndose la transmisión entre hospedadores a través de la ruta fecal-oral. En el suelo, los huevos previamente fecundados y depositados con las heces de un hospedador desarrollan un embrión que da lugar a una larva de primer estadio (L1) unos 17 días después de haber sido expulsados. Las L1 sufren dos mudas dentro del huevo, la primera a larva de segundo estadio (L2) y la segunda a larva de tercer estadio (L3), aproximadamente a las 3 y 4 semanas después de haber sido depositados, respectivamente (47,48,49). Los hospedadores se infectan al ingerir huevos que contienen las L3, los cuales eclosionan en el intestino delgado, liberando las L3, todavía cubiertas por la cutícula de la L2 (47,50). Desde el intestino delgado, las L3 migran activamente hasta alcanzar el ciego y colon proximal a partir de las 3 horas después de producirse la ingesta de huevos. En esta localización invaden la mucosa intestinal y pasan a la circulación sanguínea, a través de la cual realizan una ruta migratoria hepatopulmonar de en torno a 10 días de duración (50,51,52). A través de la circulación portal, las L3 llegan al hígado a partir de las 4 horas postinfección, donde pierden la cutícula de la L2 (48,52). Tras abandonar el hígado, entran en el corazón derecho a través de la vena cava inferior y salen de él por la arteria pulmonar, alcanzando los pulmones entre 6 y 8 días postinfección. Allí, las L3 abandonan la circulación sanguínea y pasan al interior de los alveolos pulmonares, se desplazan por el árbol bronquial hasta llegar a la tráquea, ascienden hasta la laringe y, a través del esófago, son deglutidas, alcanzando de nuevo el intestino delgado entre 8 y 10 días postinfección (53). En dicho órgano, que supone la localización definitiva del parásito, las L3 sufren dos mudas: la primera, en torno al décimo día postinfección, da lugar a las larvas de cuarto estadio (L4), y la segunda, aproximadamente 24 días después del inicio de la infección, da lugar a los vermes adultos (54). Tras alcanzar la madurez sexual, machos y hembras se aparean, y estas últimas comienzan a producir huevos entre 2 y 3 meses después del inicio de la infección, los cuales son eliminados al exterior con las heces del hospedador (revisado por [55]) (Figura 2).

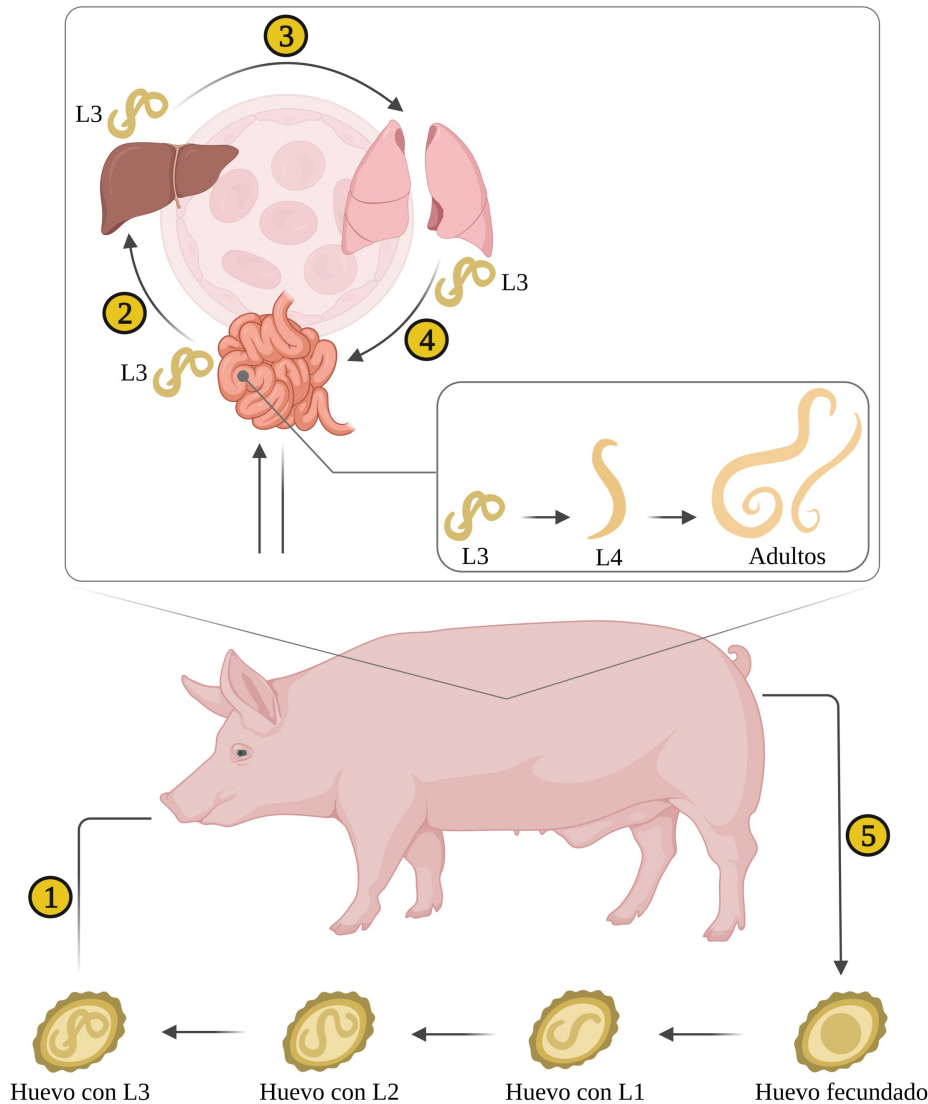


Figura 2. Ciclo biológico de *A. suum*. (1) El hospedador ingiere huevos presentes en el medio que contienen las L3, las cuales son liberadas en el intestino, donde penetran a la circulación sanguínea. A través de ella, (2) migran primero hasta el hígado y (3) después hasta los pulmones. (4) En estos últimos, las L3 abandonan el sistema circulatorio, ascienden por el árbol bronquial y, a través del esófago, retornan al intestino, donde mudan a L4 y, posteriormente, a adultos. (5) Allí, los vermes adultos se aparean y las hembras liberan al medio huevos fecundados a través de las heces del hospedador, en los que se forman las L1, que mudan a L2 y, finalmente, a L3. Abreviaturas: L1, larva de primer estadio; L2, larva de segundo estadio; L3, larva de tercer estadio; L4, larva de cuarto estadio. Figura creada con BioRender.com.

La mayor parte de las larvas son expulsadas por el hospedador antes de alcanzar la fase adulta, entre la segunda y la tercera semana después de que se inicie la infección (53). Aunque los vermes adultos que llegan a establecerse en el intestino delgado pueden vivir más de un año, muchos también son expulsados durante los primeros meses de la infección (56). Esta expulsión comienza antes y elimina mayor número de vermes cuanto mayor es la dosis infectiva, con lo que existe una relación inversa entre dicha dosis y el número de vermes hallados en el intestino (53,57).

Se ha estimado que, durante el tiempo que los vermes adultos permanecen en el intestino delgado del hospedador, cada hembra produce diariamente entre 1 y 2 millones de huevos (56,58), aunque esta estimación ha sido menor en el caso de *A. lumbricoides* (200 000 huevos al día) (59). Este número varía y se reduce con el aumento de la carga parasitaria o la edad de los vermes. Se ha observado que las hembras continúan liberando huevos fértiles en ausencia de machos (cuando estos ya han sido expulsados del hospedador) durante al menos cuatro meses. Esto podría deberse a que las hembras acumulan esperma suficiente para fertilizar huevos durante ese tiempo (56).

2.2.3. Morfología y estructura de los vermes adultos

A. suum tiene forma cilíndrica y alargada, simetría bilateral y un color cremoso anaranjado. Presenta sexos separados que muestran un marcado dimorfismo sexual. Los machos tienen una longitud de 15 a 25 cm y un diámetro de 3 a 4 mm y su extremo caudal está curvado hacia la parte ventral. Las hembras son de mayor tamaño, miden entre 20 y 40 cm de longitud y tienen un diámetro de 5 a 6 mm, con su extremo posterior sin curvatura (60) (Figura 3).

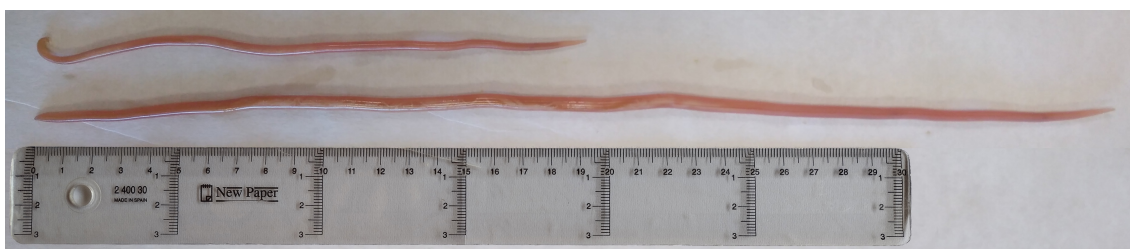


Figura 3. Vermes adultos de *A. suum*. A simple vista se aprecian las diferencias morfológicas entre un macho (arriba) y una hembra (abajo). Referencia de tamaño: regla de 30 cm de longitud.

Como todos los nematodos, los vermes de *A. suum* están revestidos por una cutícula, que también recubre el tubo digestivo y otros orificios, la cual está estructurada en diversas capas y constituida, mayoritariamente, por moléculas similares a las queratinas y los colágenos (46,61). La cutícula participa en numerosos procesos biológicos, como movimiento, absorción de nutrientes, transporte de moléculas, excreción y evasión de la respuesta inmune del hospedador, desempeñando un papel relevante en la interfase parásito-hospedador (61). Inmediatamente debajo de ella se encuentra la hipodermis, estructura sincitial encargada de sintetizar y secretar los componentes de la cutícula. Esta capa presenta cuatro engrosamientos (uno dorsal, otro ventral y dos laterales) denominados cordones hipodérmicos. Bajo ella aparece una capa

de musculatura que facilita el movimiento constante de los vermes, dificultando así su expulsión por el peristaltismo intestinal. La cavidad corporal que alberga los diferentes órganos es una cavidad pseudocelómica rellena de hemolinfa, líquido que confiere forma y turgencia al verme y permite su movimiento (46) (Figura 4A).

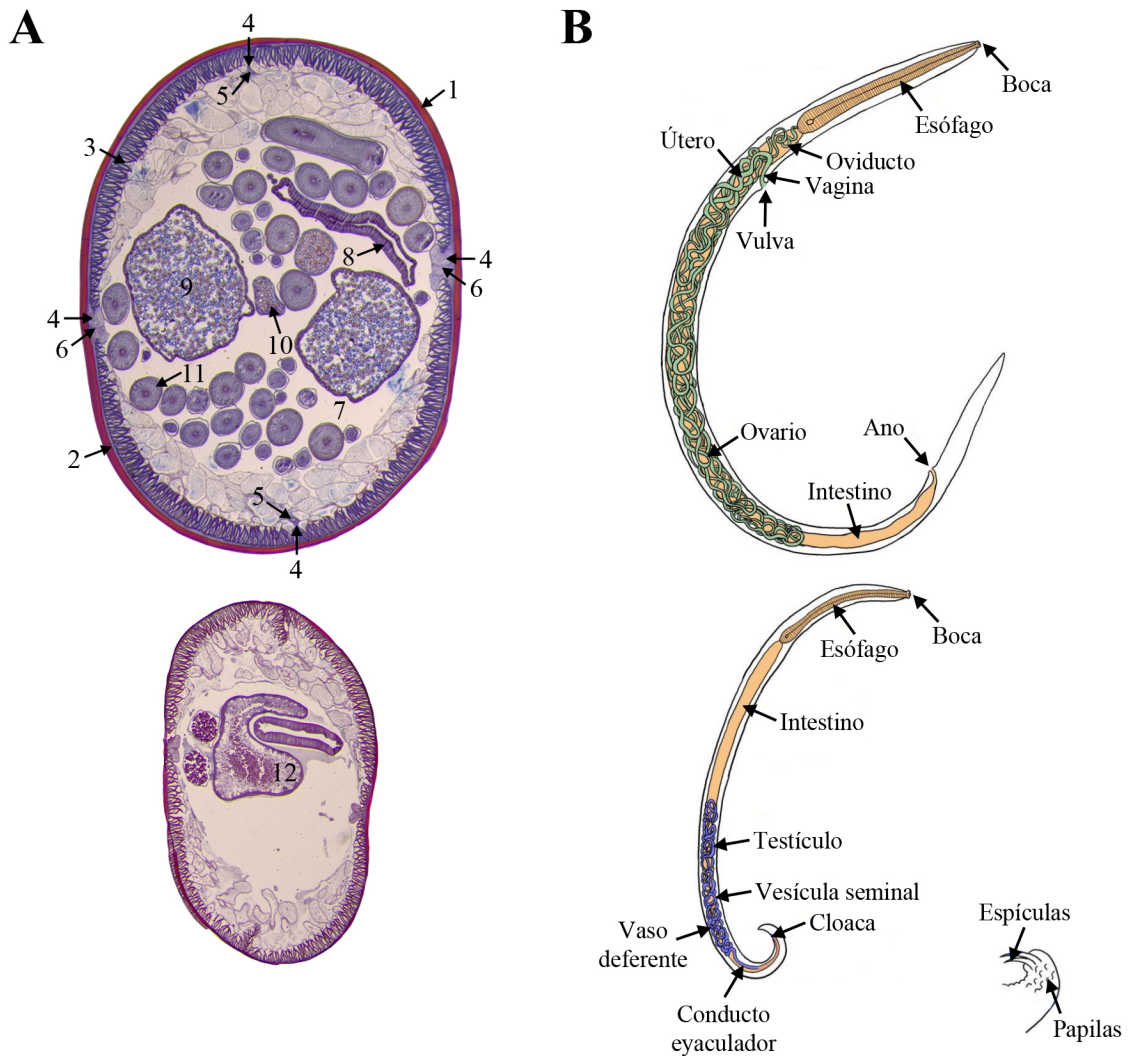


Figura 4. Estructura interna de los vermes adultos de *A. suum*. Se pueden observar las diferencias estructurales entre una hembra (arriba) y un macho (abajo). (A) Imagen de la sección transversal de vermes adultos de *A. lumbricoides* tomada a la lupa. La diferencia de tamaño que se aprecia entre los cortes histológicos de macho y hembra corresponde a la que existe en la realidad. Dichas secciones equivalen a las de los vermes adultos de *A. suum*. 1: Cutícula; 2: Hipodermis; 3: Musculatura; 4: Cordones hipodérmicos; 5: Cordones nerviosos; 6: Canales excretores; 7: Pseudoceloma; 8: Intestino; 9: Útero; 10: Oviducto; 11: Ovario; 12: Testículo. Las partes señaladas con números del 1 al 8 en el corte transversal de la hembra son idénticas para el macho. (B) Representación de la sección longitudinal de vermes adultos de *A. lumbricoides*. En el caso de *A. suum*, dicha representación es idéntica. Modificada de (62).

Los nematodos tienen un tubo digestivo completo con boca, esófago, intestino y ano (46) (Figura 4B). *A. suum* posee una boca triangular con tres labios dentados, uno dorsal más ancho y dos ventrales, cada uno de los cuales presenta una papila (63). El esófago es un potente órgano muscular de succión con glándulas que segregan enzimas. Por su parte, el intestino no tiene pared muscular y desempeña principalmente funciones de absorción y defecación, aunque también de secreción (46). A través de este órgano, el parásito absorbe nutrientes procedentes del hospedador, como ácidos grasos y glucosa (64,65). El ano en los machos desemboca en la cloaca, mientras que en las hembras se abre directamente al exterior, en una localización diferente a la vagina (66) (Figura 4B). El sistema excretor está poco desarrollado y funciona más como órgano osmorregulador y secretor que excretor. Presenta dos canales excretores que se localizan en los cordones hipodérmicos laterales (46,66) (Figura 4A). Los productos excretores/secretos liberados por los distintos órganos destinados a tal fin tienen un papel importante en la interfase parásito-hospedador, participando en funciones como la obtención de nutrientes o la defensa frente a las respuestas del hospedador (61).

El sistema nervioso de los nematodos es primitivo y está constituido por dos cordones longitudinales alojados en los cordones hipodérmicos dorsal y ventral conectados por dos anillos transversales, uno anterior (circumesofágico o circumfaríngeo) y otro en la región anal. Presenta, además, papilas sensoriales para captar estímulos periféricos (46). *A. suum* tiene un aparato reproductor muy desarrollado que ocupa dos tercios de su cuerpo (63). En el caso de las hembras, este aparato es bifurcado y cada una de sus ramas está constituida por un ovario, un oviducto, un receptáculo seminal y un útero. Ambos úteros confluyen en la vagina, que se abre al exterior en la vulva (46). El lugar en el que se sitúa la vulva presenta una constricción anular visible en el primer tercio del cuerpo que se denomina cintura genital (66). El aparato genital de los machos está formado por un testículo que continúa con el conducto eferente, la vesícula seminal, el vaso deferente y el conducto eyaculador, que desemboca en la cloaca. Junto a ella aparecen dos espículas copuladoras y numerosas papilas pre- y postanales (46,60) (Figura 4).

2.2.4. Características de los huevos

Los huevos de *A. suum* fértiles o fecundados tienen forma ovalada y miden de 45 a 75 μm de largo por 35 a 50 μm de ancho (63) (Figura 5A). Están revestidos por una

cubierta protectora que consta de tres capas. La capa interna es la membrana vitelina, rica en lípidos y parcialmente impermeable, que evita la penetración de sustancias dañinas para el embrión. Sobre ella se encuentra la capa media, compuesta por proteínas y quitina, que es gruesa y transparente y proporciona resistencia química y mecánica. En contacto directo con el exterior aparece una cubierta mamelonada que ofrece protección, que es de composición albuminoidea y se tiñe de color pardo amarillento debido a los pigmentos biliares presentes en las heces. Los huevos infértiles o no fecundados son más alargados, miden en torno a 90 μm de largo y 40 μm de ancho, y no presentan membrana vitelina interna (63,67) (Figura 5B).

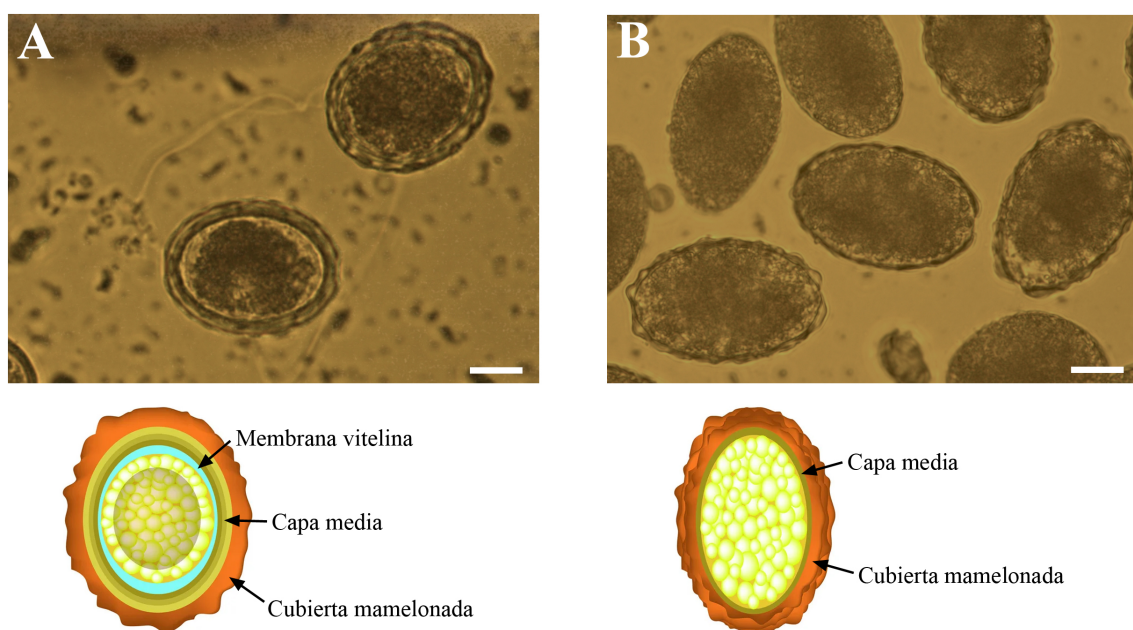


Figura 5. Huevos de *A. suum*. (A) Huevos fértiles o fecundados. (B) Huevos infértiles o no fecundados. Se pueden apreciar las diferencias entre ambos tipos de huevos, tanto en imágenes tomadas al microscopio óptico (arriba) (Barras de escala: 25 μm), como en la representación gráfica de su estructura (abajo) (Modificada de [68]).

La compleja cubierta protectora que presentan los huevos de *A. suum* hace que sean extremadamente resistentes a las condiciones ambientales (67), considerándose uno de los huevos de helmintos más resistentes (69,70). Las condiciones ambientales óptimas para su desarrollo y supervivencia implican temperaturas de entre 25 y 30 $^{\circ}\text{C}$, una humedad del 70 % y buena oxigenación (63). Sin embargo, también pueden desarrollarse y permanecer viables en condiciones más extremas. El desarrollo larvario se acelera con temperaturas elevadas, mientras que temperaturas bajas lo limitan, iniciándose de forma tardía y produciéndose lentamente, aunque no se llega a perder completamente su potencial de desarrollo (71). Por su parte, la viabilidad disminuye con el aumento de la

temperatura y la reducción de la humedad, aunque también están implicados otros factores, como el pH y las condiciones de oxigenación (69,70,72,73). No obstante, su completa inactivación no se produce hasta que se alcanzan valores extremos, principalmente de temperatura, que en raras ocasiones se dan en el suelo (70). Al igual que ocurre con las condiciones ambientales, los huevos también son extremadamente resistentes a muchos de los desinfectantes comerciales, productos químicos y pesticidas que se utilizan habitualmente para la desinfección de materiales, instalaciones y cultivos, los cuales pueden retrasar o detener el desarrollo, pero no afectan a su viabilidad (74,75).

Esta elevada capacidad de resistencia hace que los huevos de *A. suum* en estado infectivo puedan permanecer accesibles para animales y seres humanos en aguas, suelos y cultivos durante mucho tiempo. Se ha estimado que su esperanza de vida es de entre 1 y 3 meses (76). Sin embargo, se ha observado que los huevos de *A. lumbricoides* pueden permanecer viables hasta 15 años en condiciones favorables (77). Por tanto, la utilización de aguas residuales y abonos procedentes de excrementos animales sin tratar conlleva un riesgo elevado tanto para animales como para seres humanos (69). La combinación de diversos tratamientos, tanto físicos (temperatura, humedad, pH, oxigenación) como químicos (distintos tipos de desinfectantes y pesticidas), podría ser clave para lograr la desvitalización de estos agentes biológicos (69,70,78,79). Por otra parte, el incremento de la temperatura global debido al cambio climático podría contribuir a un potencial aumento de la prevalencia de *A. suum* en algunas zonas, al acelerar su proceso de desarrollo y favorecer la aparición del parásito en lugares en los que no haya sido descrito (71).

2.2.5. La larva de tercer estadio

La L3 de *A. suum* es la primera fase del parásito fuera del huevo que entra en contacto con el hospedador y aquella que realiza una extensa y compleja ruta migratoria por sus tejidos, la cual se produce, principalmente, a través del sistema circulatorio y comienza y termina en el mismo punto, el intestino delgado, lugar en el que eclosionan los huevos y en el que se establecen de forma definitiva los vermes adultos (55).

Las rutas migratorias que realizan este y otros nematodos podrían implicar riesgos para la supervivencia de las fases evolutivas que las realizan, ya que podrían extraviarse o ser atrapadas en los tejidos del hospedador. Además, implican adaptaciones morfológicas y bioquímicas costosas en términos de orientación y movimiento y

adaptación a distintas condiciones ambientales, así como un gasto energético significativo. No obstante, la fase de migración es esencial para el desarrollo de estos parásitos y constituye una estrategia de supervivencia (80). Se ha demostrado que *A. suum* no puede alcanzar su fase adulta si la L3 no completa dicha ruta migratoria (50). Asimismo, se ha observado que los nematodos que presentan una fase migratoria crecen más rápidamente y alcanzan un mayor tamaño que aquellos que se desarrollan únicamente en el tracto gastrointestinal. Dado que el tamaño corporal en los nematodos está estrechamente relacionado con la fecundidad y que el desarrollo es más rápido en parásitos migratorios, la maduración sexual de los vermes y, por tanto, su reproducción, podrían producirse de forma más óptima y temprana en aquellos organismos que presentan una fase migratoria. La migración también podría suponer una ventaja física y química, ya que el tracto gastrointestinal constituye, por lo general, un ambiente hostil. Tanto el peristaltismo intestinal como las enzimas digestivas y los componentes ácidos que se segregan continuamente en el tubo digestivo podrían comprometer la vida de la larva. Asimismo, la respuesta inmune del hospedador es más específica y localizada en otros tejidos, lo cual favorecería la supervivencia del parásito. Además, dichos tejidos son generalmente ambientes más oxigenados que el tracto gastrointestinal y proporcionan a las fases migratorias nutrientes ya procesados (80).

Durante su migración, la L3 de *A. suum* sufre un crecimiento continuo y un proceso de diferenciación. Cuando se libera del huevo en el intestino delgado, mide en torno a 255 μm de largo por 12 μm de diámetro y en ella se pueden observar las alas laterales. Durante el tiempo que permanece en el hígado, aumenta su tamaño longitudinal y diametral y experimenta importantes cambios morfológicos y estructurales. Su longitud pasa de 265 μm cuando alcanza el hígado a 630 μm poco antes de abandonarlo, y su diámetro se incrementa desde los 14 μm hasta los 27 μm en el mismo tiempo. Las alas laterales se van extendiendo hasta alcanzar la región cefálica y la cola, se produce un aumento en la longitud de esta última, aparecen algunos órganos sensoriales y el esófago ocupa, en este momento, el 24 % de la longitud total de la larva. En los pulmones, la L3 alcanza una longitud de 1440 μm y un diámetro de 52 μm . En esta localización, el esófago supone el 16,5 % de la longitud total de la larva y bajo la cutícula aparecen diferenciados algunos órganos sensoriales que están presentes en la L4 y la fase adulta (48).

2.3. Epidemiología de la ascariosis porcina

La distribución de *A. suum* entre sus hospedadores no es homogénea, pues la intensidad de la infección varía entre individuos. De este modo, la mayor parte de los hospedadores albergan pocos vermes y solo una minoría presenta elevadas cargas parasitarias (53,81). Además, los hospedadores tienden a adquirir cargas parasitarias similares en el caso de sufrir una reinfección. Las bases para entender esta heterogeneidad y la predisposición de ciertos hospedadores a adquirir el parásito no están completamente establecidas. Sin embargo, se cree que variaciones en la exposición ambiental y factores genéticos del hospedador podrían influir en los mecanismos de resistencia y susceptibilidad a la infección (55).

En cuanto a la distribución geográfica, *A. suum* es una especie cosmopolita (Figura 6). Aunque no se conocen estimaciones exactas de su extensión, está considerado el parásito intestinal más prevalente en cerdos domésticos de todo el mundo. A pesar de que las prevalencias varían en función de ciertos factores, por lo general son altas y pocas piasas están totalmente exentas del parásito (81). Dichas prevalencias también son elevadas en jabalís, lo cual favorece la persistencia y difusión del parásito. Para facilitar su visualización, los datos de prevalencia revisados en la presente Tesis Doctoral se recogen en el Anexo I.

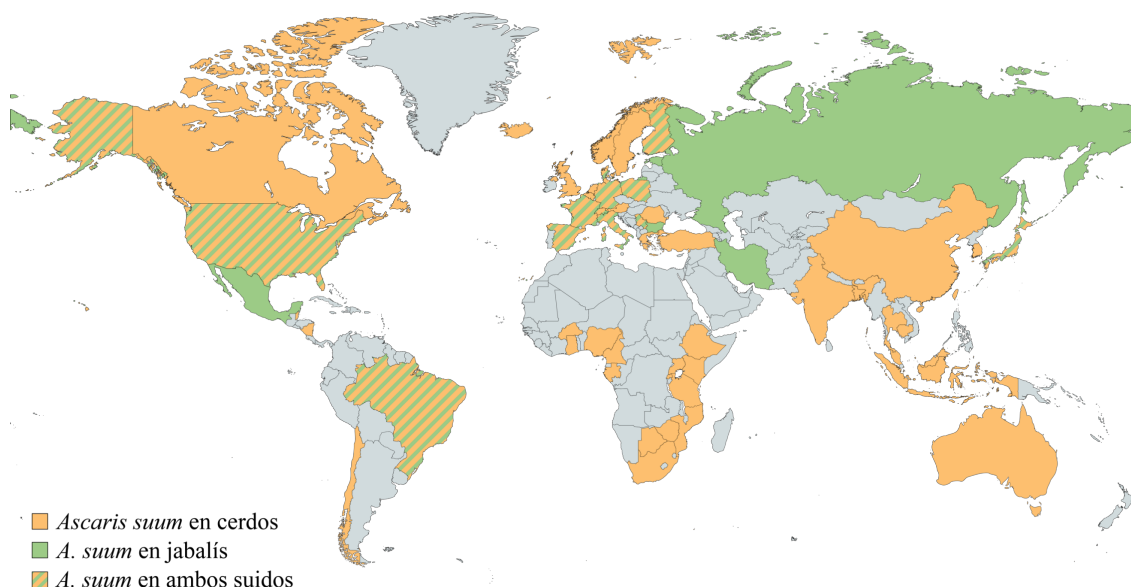


Figura 6. Mapa de distribución de *A. suum*. Los países en los que se ha denunciado la presencia del parásito en cerdos domésticos y/o en jabalís, según la bibliografía consultada, se muestran en color (naranja para cerdos y verde para jabalís). Los países que no aparecen coloreados corresponden a aquellos en los que no se han hallado referencias relativas a la presencia de *A. suum*. Figura creada con mapchart.net.

La amplia distribución y las elevadas prevalencias que presenta este parásito se deben, principalmente, a cuatro factores. En primer lugar, se trata de un parásito que no necesita ningún otro organismo aparte del propio hospedador para completar su ciclo biológico y ser transmitido. En segundo lugar, las hembras producen miles de huevos al día que son liberados al medio con las heces del hospedador. Tercero, estos huevos son extremadamente resistentes a las condiciones ambientales, pudiendo sobrevivir en el medio durante años. Finalmente, la ausencia de un interés por controlar el parásito y de herramientas diagnósticas eficientes también contribuyen a su dispersión (82).

Dado que se trata de una parasitosis transmitida al ingerir los huevos que contaminan el suelo, su distribución está notablemente influenciada por el sistema de producción de las granjas y las prácticas de manejo de las mismas, referidas principalmente a las condiciones de higiene y saneamiento. También depende de la región geográfica y de las características ambientales, así como de factores directamente relacionados con el animal, como la pira, la raza y la edad (81).

Los datos de prevalencia de *A. suum* en el ganado porcino son escasos en muchas regiones del mundo y pocos países tienen una información actualizada al respecto, por lo que son poco representativos de la situación actual. Por lo general, los datos existentes corresponden a áreas concretas dentro de un país y pocos estudios se han realizado sobre la misma zona a distintos tiempos. A ello hay que añadir el hecho de que esta información procede, en muchos casos, de cerdos o explotaciones que presentan diferentes características y que se encuentran en condiciones diversas. Además, los estudios epidemiológicos publicados hasta el momento se han llevado a cabo utilizando diferentes tamaños de muestra y distintos métodos diagnósticos, lo cual provoca aún más variabilidad entre los datos (Anexo I). Entre estos métodos destaca la coprología por ser la más utilizada, la cual puede dar lugar a una sobreestimación de la prevalencia al surgir falsos positivos debido a la coprofagia, especialmente cuando aparecen muy pocos huevos en heces. En otros casos, este tipo de análisis puede favorecer la aparición de falsos negativos, cuando se trata de infecciones con un único verme o con varios vermes del mismo sexo, provocando una infraestimación de la prevalencia, como se ha demostrado en estudios *post mortem*. Dichos estudios son llevados a cabo sobre hígados e intestinos delgados para detectar la presencia de lesiones producidas por las larvas o de vermes adultos, respectivamente. Otro método utilizado, aunque con menos frecuencia, es la detección en sangre de anticuerpos contra el parásito (81). Todos estos factores hacen

que resulte muy difícil estudiar la evolución de la incidencia a lo largo del tiempo en un mismo territorio y comparar datos de diferentes áreas geográficas. Por ello, es prácticamente imposible obtener conclusiones de los patrones epidemiológicos de distribución de la ascariosis porcina (82). A pesar de estos inconvenientes, los datos de prevalencia existentes hasta el momento sirven para reflejar la amplia distribución y la elevada prevalencia de *A. suum* en el ganado porcino de todo el mundo (Anexo I).

2.4. Patología de la ascariosis porcina

La mayoría de las infecciones producidas por *A. suum* en cerdos son subclínicas. Sin embargo, tanto la migración de las larvas por los tejidos de su hospedador como la presencia de los vermes adultos en el intestino delgado tienen consecuencias patológicas para los animales infectados (81).

2.4.1. Daños producidos por la migración de las larvas

Los daños más graves asociados a la migración de las larvas de *A. suum* se producen en el hígado y los pulmones. No obstante, en el intestino también aparecen lesiones, como petequias, infiltrados celulares y edema (60,81). El impacto que todos estos daños tienen sobre el estado nutricional del cerdo y su peso corporal apenas se conoce, si bien se ha observado que la conversión de alimento y la ganancia de peso diaria mejoran al tratar cerdos infectados experimentalmente con antihelmínticos durante la fase de migración larvaria (83).

2.4.1.1. Daños en el hígado

La migración de las larvas por el hígado produce la destrucción de células hepáticas, que son sustituidas por deposiciones interlobulillares de tejido fibroso e infiltrados celulares. Esto da lugar a la formación de lesiones fibróticas blanquecinas, conocidas como «manchas de leche» o «manchas blancas» (del inglés *milk/white spots*), que dan un aspecto moteado al hígado afectado y constituyen las lesiones más características de la ascariosis porcina (82,84) (Figura 7). Estas lesiones pueden ser superficiales o profundas y están acompañadas de trayectorias migratorias necróticas y hemorrágicas (85,86).



Figura 7. «Manchas de leche» atribuidas a *A. suum* en un hígado de cerdo procedente de un matadero localizado en la provincia de Salamanca (España).

Atendiendo a su morfología e histopatología, se distinguen dos tipos principales de «manchas de leche»: las de tipo granuloso (GT-WS) y las de tipo linfonodular (LN-WS). Las GT-WS son lesiones en forma de malla caracterizadas por el aumento de tejido conectivo en los tabiques interlobulillares. Surgen como pequeños focos hemorrágicos necróticos con tabiques interlobulillares estrechos que progresan a lesiones granulomatosas compuestas por un centro de material necrótico amorfo y tabiques interlobulillares más gruesos. Las áreas necróticas están rodeadas de infiltrados celulares compuestos, de forma mayoritaria, por neutrófilos y eosinófilos, mientras que el tejido conectivo fibroso circundante está acompañado de macrófagos, fibroblastos y linfocitos. En ocasiones, estas lesiones granulomatosas encierran en su interior restos de una larva y constan de una masa central de tejido conectivo fibroso compacto, las cuales se denominan GT-WS grandes (Figura 8A). Las GT-WS pequeñas se forman alrededor de rutas migratorias de las larvas y carecen de un centro compacto, conservando el patrón lobulillar (Figura 8B). Por su parte, las LN-WS son nódulos redondeados, elevados, bien definidos y claramente delimitados, con leve engrosamiento de los tabiques interlobulillares adyacentes (Figura 8C). Estas lesiones consisten en infiltrados de linfocitos y células plasmáticas rodeados de tejido fibroso subcapsular o interlobulillar (53,84,85,87-89).

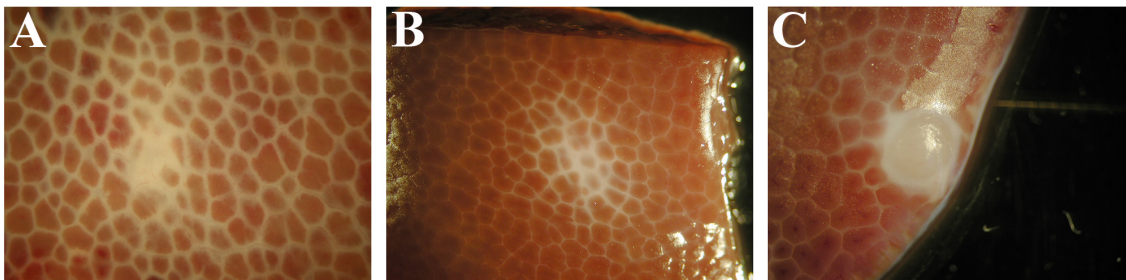


Figura 8. Tipos de «manchas de leche» producidas por larvas migratorias de *A. suum*. (A) GT-WS grandes. (B) GT-WS pequeñas. (C) LN-WS. Imágenes extraídas de (81).

Las «manchas de leche» desaparecen gradualmente durante las primeras semanas de la infección. Se reduce el engrosamiento de los tabiques interlobulillares y la infiltración celular, modificándose el aspecto de las lesiones, que se vuelven menos blancas (53,87). Sin embargo, el hígado no recupera su textura normal y se endurece como consecuencia de la migración larvaria (81). Las GT-WS aparecen en torno al tercer día postinfección y comienzan a desaparecer una semana después, hasta ser prácticamente inexistentes a partir de los 17 días posteriores al inicio de la infección. Las LN-WS surgen en torno a los 10 días postinfección y se mantienen durante aproximadamente 2 meses (53). Dado que la aparición de las LN-WS coincide con la disminución en número de las GT-WS, se ha sugerido que estas últimas podrían ser precursoras de las primeras (53,85,86).

2.4.1.2. Daños en los pulmones

En los pulmones se observan lesiones similares a las «manchas de leche» halladas en el hígado. Estas lesiones han sido descritas como formaciones granulomatosas o áreas diseminadas de fibroplasia. Estas últimas constan de un foco central irregular de fibrosis que está rodeado de hemorragia. En el tejido fibroso aparecen acumulaciones compuestas por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, además de eosinófilos. Algunas de ellas también contienen restos de una larva (84,90). Aunque estas lesiones, al igual que las «manchas de leche» del hígado, desaparecen en 40 días aproximadamente, pueden dejar secuelas (60).

Durante la migración pulmonar de *A. suum*, los animales parasitados pueden sufrir broncoespasmo, disnea, aumento de la frecuencia respiratoria y tos seca (81,86). Estas manifestaciones recuerdan al síndrome de Loeffler, síndrome respiratorio transitorio descrito en humanos y atribuido a *Ascaris* que se caracteriza por neumonía eosinofílica. Esta afección comporta la aparición de infiltrados pulmonares de eosinófilos y eosinofilia

periférica (91). Los eosinófilos secretan al tejido pulmonar los gránulos que contienen, dando lugar a neumonitis y la consecuente alteración de las vías respiratorias (81,86).

2.4.2. Alteraciones asociadas a los vermes adultos

La presencia de los vermes adultos de *A. suum* en el intestino delgado provoca cambios estructurales y morfológicos en la mucosa intestinal de los cerdos, no solo en aquellos lugares donde se localizan los vermes, sino en todas las áreas del intestino



Figura 9. Cúmulo de vermes de *A. suum* en el intestino delgado de un cerdo, provocando enteritis e hiperemia. Imagen extraída de (94).

delgado (92,93). Entre estas alteraciones se encuentran el aumento de la profundidad de las criptas y la disminución de la altura de las vellosidades, de manera que se reduce la relación entre ambos parámetros y, con ello, la proporción de mucosa intestinal disponible para la absorción de nutrientes. También surgen infiltrados de mastocitos y eosinófilos en la lámina propia y se produce hipertrofia de la *muscularis mucosae*, esto último directamente relacionado con la carga parasitaria que presenta el animal (92).

Otras manifestaciones que se aprecian en el intestino son enteritis, hiperemia y erosiones (Figura 9). Por otra parte, el estadio adulto de *A. suum* compite con su hospedador por los nutrientes que llegan al intestino delgado del cerdo (60).

Todo ello hace que la ascariosis porcina tenga importantes efectos nutricionales sobre los animales parasitados. Se produce una reducción en el consumo de alimento y en la eficiencia de conversión de dicho alimento. Disminuye la digestión y absorción de grasas, así como la digestión de materia seca y proteína cruda. También se reduce la retención de nitrógeno y la actividad lactasa, observándose alteraciones en la tolerancia a la lactosa. En consecuencia, surgen deficiencia nutricional y reducción de la tasa de crecimiento y de la ganancia de peso. Tanto la disminución en la eficiencia de conversión del alimento como la reducción en la ganancia de peso están correlacionadas con la carga parasitaria (92,95,96).

En algunas ocasiones, puede llegar a producirse obstrucción del intestino delgado, aunque su perforación es muy poco frecuente. Alteraciones en las heces, la piel o la reproducción también se han relacionado con la ascariosis porcina (60).

2.5. Mecanismos celulares y moleculares de las relaciones parásito-hospedador en la ascariosis porcina

La migración de las larvas de *A. suum* por los tejidos de su hospedador desencadena una serie de respuestas celulares y moleculares, tanto en el hospedador (respuesta inmune) como en el parásito (modulación y evasión de la respuesta inmune). Estas respuestas, junto con aquellas provocadas por la presencia de los vermes adultos en el intestino delgado, dan lugar a los procesos patogénicos que se desarrollan en el hospedador durante la ascariosis porcina.

2.5.1. Mecanismos de invasión y migración parasitaria

Los estudios que abordan los mecanismos moleculares que rigen la invasión y migración parasitarias en la ascariosis porcina son ciertamente escasos. No obstante, la caracterización del genoma de *A. suum* ha permitido predecir la existencia de algunos grupos de moléculas, principalmente proteasas, que potencialmente podrían facilitar estos procesos (97). Por otra parte, en un modelo *in vitro*, larvas infectivas de *A. suum* en contacto con células del epitelio intestinal de cerdo aumentan la expresión de genes que codifican proteínas que dirigen la actividad motora de las larvas, como miosina, troponina y mioglobina, enzimas proteolíticas, como la proteasa aspártica 6 y la hialuronidasa, y alérgenos del veneno (VAL). La secreción de proteasas y otras proteínas implicadas en la invasión parasitaria, como VAL, junto con el aumento de la actividad motora, podrían ser esenciales para la penetración de las larvas de *A. suum* en el epitelio intestinal y su posterior migración por los tejidos de su hospedador (98).

2.5.2. Respuesta inmune del hospedador

2.5.2.1. Respuesta inmune en una primera infección

La respuesta inmune frente a *A. suum* en cerdos al inicio de la infección está polarizada hacia una respuesta Th1 (linfocito T *helper* 1) de tipo celular, pues se produce el reclutamiento de macrófagos y un aumento en la expresión génica de la interleucina 12

(IL-12) y el interferón γ (IFN- γ) cuando los huevos infectivos del parásito llegan al intestino del hospedador. Sin embargo, conforme avanza la infección, se produce un cambio hacia una respuesta de tipo Th2 (linfocito T *helper* 2) (99), caracterizada por la secreción de interleucinas que inducen la producción de anticuerpos y favorecen la inmunidad humoral (100). Esta respuesta Th2 es patente tanto a nivel sistémico, con eosinofilia y aumento en la producción de la interleucina 4 (IL-4) y las inmunoglobulinas A (IgA), M (IgM), G (IgG) y E (IgE) específicas para *A. suum*, como a nivel local, al desencadenar cambios moleculares y celulares en el hígado, los pulmones y el intestino delgado (99,101-104). Esta polarización Th1-Th2 responde al patrón general de la inmunidad desencadenada por las infecciones producidas por helmintos parásitos (100).

La eliminación de la mayor parte de los individuos parásitos que llegan al hospedador se produce en el intestino delgado, una vez que las larvas alcanzan esta localización tras realizar la migración hepatopulmonar, unos días antes de que se desarrollen a adultos. Por ello, la respuesta Th2 local frente a *A. suum* ha sido especialmente estudiada en este órgano (53,102). Este mecanismo de expulsión del parásito se desencadena de forma local, independientemente del paso previo de las larvas por el hígado y los pulmones, y lleva asociados una serie de cambios en el intestino delgado del hospedador. En él se incrementan los niveles de expresión génica de las interleucinas 4, 5 (IL-5) y 13 (IL-13) (99,101). La IL-5 participa en el reclutamiento de eosinófilos, mientras que la IL-4 y la IL-13 intervienen en la expulsión del parásito del intestino de su hospedador en otras parasitosis y aumentan la contractilidad del músculo liso intestinal (100). En efecto, en infecciones producidas por *A. suum* se ha observado un incremento en la contractilidad de este músculo, lo que genera mayor movimiento intestinal, que favorece la expulsión del parásito (99,101). En la mucosa intestinal de cerdos infectados por *A. suum* se encuentran anticuerpos IgA e IgM específicos para este parásito, y los primeros han sido propuestos como mediadores de su eliminación. Este hecho demuestra que el hospedador reconoce y responde a la presencia de *A. suum* en el intestino delgado y que la inmunidad generada implica respuestas dependientes de células T y B específicas de antígeno (102). También se produce un incremento en el número de eosinófilos de la mucosa intestinal, que disminuye a niveles previos a la infección tras la eliminación del parásito, así como de linfocitos T intraepiteliales, lo que sugiere que ambos tipos de leucocitos desempeñan un papel importante en la defensa innata contra *A. suum* (99). La actividad de los mastocitos de la mucosa también se intensifica durante la

infección por *A. suum* (101). Estas células producen citocinas de tipo Th2 y son la principal fuente de histamina, la cual participa en el reclutamiento de eosinófilos e induce la contracción del músculo liso (105).

Al igual que ocurre en el intestino delgado, en el hígado y los pulmones aumenta la expresión de citocinas asociadas a una respuesta Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, así como de genes asociados a eosinófilos y mastocitos (106). En el caso del hígado, la respuesta local humoral está representada, principalmente, por células plasmáticas secretoras de IgG (89).

2.5.2.2. Respuesta inmune en reinfecciones

Cuando cerdos previamente infectados con *A. suum* sufren una reinfección, se observa una respuesta inmune elevada y específica, principalmente a nivel del intestino delgado, cuando las larvas son liberadas del huevo y se produce el primer contacto entre parásito y hospedador (105,107,108). La protección del hospedador frente a la invasión de las larvas depende de una respuesta Th2 propagada por mastocitos y eosinófilos (105). En reinfecciones, en los sitios de penetración de las larvas en la mucosa intestinal, se detecta mastocitosis y eosinofilia, así como niveles elevados de transcripción génica para IL-5, IL-13 y otras moléculas implicadas en el desarrollo, reclutamiento y activación de eosinófilos (105,107). Asimismo, se observa hiperplasia de las células caliciformes. En otras nematodosis intestinales, el aumento de la producción de moco forma parte de una respuesta Th2, lo que podría contribuir a atrapar las larvas y dificultar su penetración en la mucosa (105). En el intestino delgado, además de en los pulmones, se ha detectado mayor concentración de IgA, lo que sugiere que la producción local de este anticuerpo está implicada en la protección frente a las larvas migratorias (109).

Experimentos *in vitro* realizados con larvas infectivas de *A. suum* y suero de cerdos previamente infectados con el parásito han sugerido la existencia de anticuerpos específicos contra estas larvas, así como la participación de eosinófilos en su eliminación (105,107,110). En efecto, cerdos re infectados presentan niveles elevados en suero de IgG, IgM e IgA contra antígenos de las larvas, así como un incremento en el número de eosinófilos en sangre (108,111,112). Se ha postulado que las IgG podrían desempeñar un papel protector a nivel prepulmonar, aunque no a nivel prehepático, mientras que las IgM participarían en la resistencia del hospedador contra las larvas migratorias a ambos niveles (112).

Este elevado grado de inmunidad frente a *A. suum*, principalmente a nivel del intestino delgado, tras la exposición del hospedador al parásito, resulta en una reducción del número de «manchas de leche» en el hígado y de larvas en los pulmones (105,107-109,113,114). Este hecho ha sido atribuido a la existencia de una barrera intestinal, denominada barrera prehepática, que impide que las larvas alcancen la circulación sanguínea, migren y, por tanto, lleguen al intestino delgado para establecerse en él de forma definitiva (107,108). En experimentos *in vitro* se ha detectado una disminución en la actividad y supervivencia de las larvas al ser incubadas con suero de cerdos previamente infectados con el parásito (110). Aunque la expulsión de las larvas que superan esta barrera y alcanzan el intestino delgado se produce en el mismo momento que en una primera infección, esta expulsión es más rápida en reinfecciones. Además, se ha observado que, en estos casos, los vermes que alcanzan el estadio adulto son más pequeños (111).

2.5.3. Modulación y evasión del sistema inmune del hospedador por parte del parásito

Análisis genómicos y proteómicos de diferentes estadios del parásito (L3, L4 y adulto), así como de las vesículas extracelulares liberadas por estas fases evolutivas, han permitido identificar en ellos proteínas con propiedades inmunomoduladoras (97,115-117). Además, se cree que péptidos excretados/secretados por el parásito podrían participar en la evasión del sistema inmune al enmascarar antígenos parasitarios imitando moléculas del hospedador, como ocurre con algunas lectinas de tipo C que presentan una estrecha homología con la manosa de macrófagos de vertebrados o con CD23, el receptor de baja afinidad de la IgE (97). Algo similar podría ocurrir con proteínas del hospedador que el parásito adhiere a su cutícula, como el componente 3 del complemento (C3) (118). Todo ello sugiere que *A. suum* desarrolla complejas estrategias para manipular, bloquear y/o evadir la respuesta inmune de su hospedador (97).

En cerdos con infecciones crónicas se ha observado que el parásito es capaz de modular su entorno inmunológico en la mucosa intestinal al inhibir rutas transcripcionales del hospedador relacionadas con respuestas inmunitarias e inflamatorias, principalmente implicadas en la producción de citocinas y de moléculas proinflamatorias y de procesamiento de antígenos (119). Resultados similares han sido descritos en un modelo

de células epiteliales intestinales porcinas incubadas con larvas infectivas de *A. suum*, en el que se detectó baja expresión de genes que participan en estas respuestas (98).

No obstante, la mayor parte de los estudios que han puesto de manifiesto la capacidad inmunoreguladora de *A. suum* han empleado modelos *in vivo* de ratón estimulados con extractos de vermes adultos del parásito, glicosfingolípidos o la proteína supresora de *A. suum* PAS-1, previa inducción de la respuesta inmune con una molécula inmunógena (ovoalbúmina, lipopolisacárido o la proteína alergénica de *A. suum* APAS-3). Los resultados obtenidos en los diferentes modelos son similares y coinciden en la capacidad que tiene *A. suum* para regular la respuesta inmune celular y humoral de su hospedador al mostrar una potente actividad inmunomoduladora sobre las respuestas Th1 y Th2, la producción de anticuerpos y la generación de reacciones inflamatorias y de hipersensibilidad. El efecto del parásito sobre la producción de citocinas ha sido estudiado en diversos tipos celulares, como macrófagos, células de los ganglios linfáticos, del bazo y de los pulmones, obteniéndose resultados discordantes. En general, se ha postulado que *A. suum* estimularía la producción de citocinas reguladoras, como la interleucina 10 (IL-10), que inhibirían la secreción de citocinas proinflamatorias y mediadoras de la proliferación, diferenciación y activación de células inmunitarias, como las interleucinas 1 β (IL-1 β), 2 (IL-2), 4, 5, 6 (IL-6) y el IFN- γ . Los datos existentes en los diferentes estudios respecto a la producción de anticuerpos (IgG, IgE e IgM), la proliferación y migración de células inflamatorias, la liberación de eotaxina, el número de eosinófilos o la actividad de la peroxidasa eosinofílica coinciden en que el parásito ejerce un efecto modulador sobre todos ellos (120-130). Estos resultados se corroboran con los obtenidos por Titz *et al.* (131) en infecciones experimentales realizadas con *A. suum* en ratón.

El potente efecto modulador de *A. suum* sobre el sistema inmune de su hospedador podría deberse, al menos en parte, a la capacidad del parásito para alterar la función de las células presentadoras de antígeno (132). Estudios *in vitro* realizados con células mononucleares de sangre periférica, células dendríticas y macrófagos, todos ellos expuestos a extractos de *A. suum* y previamente estimulados con lipopolisacárido, muestran una disminución en la secreción de citocinas por parte de estas células, lo que indica una actividad moduladora del parásito sobre estos tipos celulares (119,127,133-135). En el caso de las células dendríticas se ha observado, además, que *A. suum* interfiere en su capacidad para activar y estimular la proliferación de células T específicas de antígeno (119,132).

2.5.4. Mecanismos patogénicos

Los mecanismos patogénicos en la ascariosis porcina a nivel molecular tampoco son bien conocidos. Se ha sugerido que las lesiones que aparecen en el hígado y los pulmones, así como en el intestino al inicio de la infección, surgen como consecuencia del daño mecánico infligido por la penetración y migración de las larvas y de la respuesta inmune inflamatoria asociada a su migración y a la liberación de material antigénico (82,86,136). En cuanto a las deficiencias nutricionales resultantes de la presencia de los vermes adultos en el intestino delgado, se ha postulado que podrían deberse, al menos en parte, a alteraciones inducidas por el parásito en el transporte de nutrientes, las cuales conducirían a una disfunción en la absorción gastrointestinal. En efecto, se ha observado que tejidos intestinales de cerdo muestran deficiencias en el transporte de glucosa, alanina y dipéptidos al estar en contacto con *A. suum* (137,138).

2.6. Diagnóstico de la ascariosis porcina

El diagnóstico es necesario para determinar la presencia, prevalencia e intensidad del parásito en un animal o una explotación y valorar si es necesario aplicar ciertas medidas de control o si las que ya existen son efectivas. También es parte fundamental de los estudios epidemiológicos. Los métodos que se emplean para identificar esta parasitosis son diversos y van desde procedimientos basados en la observación directa de vermes, huevos o lesiones hasta pruebas serológicas (139). La identificación molecular por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se utiliza para realizar análisis comparativos entre *Ascaris* de origen porcino y humano (140-142) o para detectar la presencia de *A. suum* en el hospedador humano (143), pero no se destina al diagnóstico rutinario de la ascariosis porcina. Las limitaciones que presentan los distintos métodos, junto con el carácter subclínico de la ascariosis porcina, son los principales factores responsables de que esta parasitosis haya sido infravalorada por ganaderos y veterinarios (139).

2.6.1. Observación de vermes en las heces o el intestino delgado

El diagnóstico de la ascariosis porcina se puede llevar a cabo mediante la observación directa de vermes del parásito, bien en las heces de los animales infectados, al ser expulsados de forma natural o tras un tratamiento antihelmíntico, bien *post mortem* en el intestino delgado de los cerdos sacrificados en un matadero (81,82). Este método

puede dar lugar a falsos negativos, pues los animales pueden estar parasitados con estadios larvarios, los cuales pueden no ser detectables o distinguibles en dichos materiales biológicos (82).

2.6.2. Análisis coprológicos

La detección de huevos del parásito en las heces también puede probar la presencia de *A. suum* en cerdos. Esta se lleva a cabo mediante diversas técnicas, entre las que se encuentran las de Kato-Katz, MIF (mertiolato-yodo-formol), flotación, sedimentación (como el método Telemann), McMaster y Stoll (144). Todas ellas son técnicas principalmente cualitativas, ya que solamente permiten determinar si el parásito está presente en el hospedador, a excepción de las dos últimas, que posibilitan hacer una estimación del número de huevos por gramo de heces (82,144). No obstante, el número de huevos en las heces no es representativo del número de vermes adultos en el intestino delgado, ya que los huevos solo son liberados por las hembras del parásito y la cantidad que producen depende de distintos factores, como el momento de la infección u otros asociados al parásito o al hospedador (144).

Los análisis coprológicos son fáciles de realizar y precisan de materiales relativamente económicos, pero presentan algunos inconvenientes. Son laboriosos y requieren tiempo, por lo que no son eficientes cuando se trata de examinar un número elevado de muestras. Además, tienen baja sensibilidad (82). Con frecuencia, dan lugar a falsos negativos, cuando en el hospedador aparece un único verme o solamente vermes inmaduros o vermes maduros de un solo sexo (81,82,145). Asimismo, es habitual observar falsos positivos como resultado de la coprofagia o geofagia, especialmente cuando se detectan pocos huevos (146).

2.6.3. Observación de lesiones en el hígado o los pulmones

La observación *post mortem* de lesiones en el hígado o los pulmones puede indicar una infección por *A. suum*. Las lesiones más características son las «manchas de leche», principalmente las que aparecen en el hígado, mientras que en los pulmones se pueden encontrar, además, signos de neumonía o pleuritis (139).

Al igual que ocurre con los huevos que aparecen en las heces, la cantidad de lesiones que se observa en el hígado no se relaciona con el número de vermes adultos en el intestino delgado (82). En efecto, pueden existir «manchas de leche» en el hígado y no

encontrarse vermes en el intestino delgado, lo cual significaría que la infección es reciente o que ya ha sido resuelta por el sistema inmune. No obstante, cuando estas lesiones están presentes, es muy probable que la infección exista (82,147). Dado que las «manchas de leche» solamente reflejan una migración larvaria reciente (de 5 a 6 semanas) (81), este método no permite identificar infecciones a largo plazo. Por tanto, presenta una alta sensibilidad y una baja especificidad (82,147). Pese a que lesiones similares pueden ser ocasionadas por otros parásitos, se asume que las «manchas de leche» que aparecen en sistemas de producción comerciales en zonas templadas son producidas por *A. suum* (81). Otro de los principales inconvenientes de esta técnica es que la evaluación visual de los hígados es muy subjetiva, especialmente cuando presentan pocas lesiones (82,147).

2.6.4. Técnicas serológicas

Las desventajas asociadas a los métodos de diagnóstico convencionales han suscitado la necesidad de crear alternativas, como las pruebas serológicas, basadas en la detección de anticuerpos específicos frente al parásito en muestras de suero de cerdos. Dadas las características que presenta la ascariosis porcina, el diagnóstico debe estar dirigido a la detección tanto de los estadios larvarios como de los vermes adultos, condición que no cumple ninguno de los métodos anteriores y que podrían suplir las técnicas serológicas (82). Además, estas técnicas han mostrado ser más sensibles que los métodos descritos anteriormente (148). Sin embargo, también presentan algunos inconvenientes. No distinguen entre infecciones presentes y pasadas (77) y, por lo general, se precisa de personal técnico especializado para llevar a cabo la obtención de las muestras (82). Pese a que los estudios conducentes al desarrollo de un test serológico para el diagnóstico de las infecciones producidas por *A. suum* se iniciaron hace algunas décadas, su creación y comercialización es relativamente reciente (139).

Inicialmente, se emplearon ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y/o *Western blot* para detectar anticuerpos anti-*A. suum* en suero de cerdos frente a diferentes extractos del parásito, bien de larvas, bien de adultos, los cuales mostraron ser efectivos para el diagnóstico de la ascariosis porcina. Sin embargo, algunos de estos ensayos no presentaron valores de sensibilidad y/o especificidad adecuados, aunque esto pudo deberse a que, para validar la técnica, se utilizaron métodos de diagnóstico convencionales (149-151). En todo caso, ninguno de ellos llegó a tener una aplicación práctica (139). Más adelante, se desarrolló un ELISA empleando una única molécula

como antígeno, una hemoglobina purificada del fluido pseudocelómico de vermes adultos de *A. suum* (AsHb). Al evaluar su capacidad diagnóstica en cerdos infectados experimentalmente con *A. suum*, esta prueba mostró elevada sensibilidad y especificidad en la detección de la ascariosis porcina a largo plazo (152). De hecho, la sensibilidad de este método fue superior a la de los análisis coprológicos y la observación de «manchas de leche» en el hígado (139). Actualmente, este test serológico se comercializa y tiene aplicación práctica en el diagnóstico de esta parasitosis (SERASCA[®]-test y MonoScreen AbELISA *Ascaris suum*). Posteriormente, se ha probado un ELISA que utiliza como antígeno un homogenado proteico de la L3 pulmonar, el cual revela elevada sensibilidad y especificidad y, por ende, también podría ser útil para el serodiagnóstico de la ascariosis porcina (153,154).

2.7. Control de la ascariosis porcina

Puesto que, en la mayoría de los casos, la infección producida por *A. suum* en cerdos cursa sin manifestaciones clínicas, la ascariosis porcina pasa generalmente inadvertida en las explotaciones. Además, una vez que el parásito se introduce en una de ellas, resulta muy difícil su completa eliminación debido a las características biológicas que presenta y a la propia configuración de las granjas. Por ello, es fundamental la profilaxis, que se basa, actualmente, en el tratamiento con antihelmínticos. No obstante, para lograr un control efectivo de esta parasitosis, el tratamiento farmacológico debe ir acompañado de unas correctas prácticas de manejo (82).

2.7.1. Tratamiento farmacológico

Cuando se selecciona un tratamiento preventivo contra la infección producida por *A. suum* se consideran varios factores, como la eficacia que presenta contra los distintos estadios del parásito, el margen de seguridad del fármaco, su espectro de actividad, el modo de administración y el coste (82). Son numerosos los compuestos químicos que han demostrado ser eficaces contra los vermes adultos de *A. suum*. Entre ellos se encuentran organofosforados (diclorvos), imidazotiazoles (levamisol), piperazina, pirantel, benzimidazoles (cambendazol, fenbendazol, flubendazol, oxibendazol, oxfendazol) y lactonas macrocíclicas (ivermectina, doramectina, abamectina) (155-163). Parte de estos compuestos, como pirantel, fenbendazol, flubendazol, ivermectina y doramectina, también han mostrado eficacia contra las fases larvianas del parásito (83,157,164-166).

Recientemente, Dmitryjuk *et al.* (167) han demostrado *in vitro* el efecto ovicida contra *A. suum* del benzimidazol S-metil-(2-metoxicarbonilamino-benzoimidazol-5) tiosulfonato. De todos ellos, los más empleados actualmente son los pertenecientes a los grupos de benzimidazoles y lactonas macrocíclicas (168). Todos los antihelmínticos modernos son altamente eficaces, muy seguros y de amplio espectro. El modo, la dosis y el periodo de administración, así como el coste del tratamiento, varían con cada antihelmíntico (82).

A pesar de que *A. suum* es, hasta el momento, extremadamente susceptible a los antihelmínticos utilizados (168), la aplicación masiva de estos fármacos entraña algunos inconvenientes. En primer lugar, los tratamientos no se aplican de forma sistemática y el plan de tratamiento varía dependiendo de la explotación y la clase de animal. Dada la actividad residual nula o limitada que presentan estos medicamentos, los cerdos están expuestos continuamente a nuevas infecciones, por lo que sería necesario persistir en la aplicación repetida del tratamiento para que este tuviera un efecto sobre la presencia del parásito en la granja. De hecho, para disminuir la intensidad de una parasitosis en una explotación, la frecuencia del tratamiento debería estar basada en el periodo de prepatencia del parásito, que en *A. suum* es de 6 semanas. En segundo lugar, el modo de administración del fármaco más sencillo y económico es el que se lleva a cabo por vía oral, pero esto proporciona una dosis variable a los distintos individuos cuando se administra a un grupo de cerdos a partir de una misma fuente. Por el contrario, la inyección del medicamento es más precisa en cuanto a la dosis, pero es costosa en tiempo, trabajo y dinero, además de presentar un tiempo de retirada mayor. En tercer lugar, debido al bajo grado de absorción que presentan algunos de estos fármacos, los animales tratados excretan elevadas cantidades de estas sustancias (82), las cuales son, además, parcialmente resistentes a la degradación (169). De este modo, las aguas residuales y la utilización de excrementos animales para abonar la tierra propagan estos compuestos y sus residuos, lo que puede tener consecuencias perjudiciales a largo plazo sobre el medio ambiente y los seres vivos (82,169-172). Por último, aunque hasta el momento no se ha denunciado resistencia antihelmíntica en *A. suum*, el hecho de que sí haya surgido en otros parásitos porcinos, como *Oesophagostomum* spp., y en especies filogenéticamente próximas a *A. suum*, como el parásito equino *P. equorum* (173-176), sugiere que malas prácticas continuadas en la aplicación de estos tratamientos podrían conducir a la aparición de resistencia antihelmíntica en *A. suum* (82).

2.7.2. Estrategias de control alternativas al tratamiento farmacológico

Los inconvenientes asociados a la aplicación masiva de antihelmínticos sugieren la necesidad de crear medidas de control alternativas para prevenir las infecciones producidas por *A. suum* (82).

2.7.2.1. Vacunación

Una de estas aproximaciones es la vacunación. El hecho de que los cerdos desarrollen rápidamente una resistencia natural a reinfecciones por *A. suum* sugiere la posibilidad de que dicha estrategia pudiera resultar eficaz. Sin embargo, y aunque las investigaciones en este contexto comenzaron hace más de medio siglo, los ensayos de protección desarrollados hasta el momento no se han traducido en la comercialización de una vacuna eficaz frente a la ascariosis porcina. Las particularidades que presenta *A. suum*, añadidas a las dificultades que entraña el desarrollo de cualquier vacuna, explicarían este estancamiento (82).

Los primeros ensayos en esta línea datan de los años 60, cuando Taffs observó protección frente a *A. suum* al inmunizar cobayas con suero de animales previamente infectados y detectó anticuerpos anti-*A. suum* en cerdos inmunizados con extractos del aparato reproductor de hembras del parásito (177,178). En las décadas posteriores, se realizaron diversos ensayos en los que se inocularon huevos de *A. suum* atenuados con radiación ultravioleta a cerdos. Los animales inmunizados desarrollaron una fuerte resistencia a la infección por el parásito, pues el número de adultos en el intestino delgado o de larvas en los pulmones se redujo en más del 85 % respecto a los animales no inmunizados (179-181). Porcentajes inferiores se obtuvieron al inocular a cerdos diferentes extractos del parásito (productos derivados de huevos infectivos, productos excretores/secretores de larvas o fragmentos de la cutícula de larvas o adultos) mezclados con un adyuvante (hidróxido de aluminio o adyuvante incompleto de Freund). Aunque estas fórmulas indujeron una respuesta protectora frente a la migración pulmonar del parásito, también provocaron una marcada respuesta patológica en el hígado (181,182). En modelos de ratón, otros extractos antigénicos (extracto crudo de adulto, de la cutícula de adulto o de larva infectiva) provocaron una reducción del 50-60 % en el número de larvas en los pulmones al ser administrados junto con monofosforil lípido A como adyuvante. A esta inmunidad protectora contribuyeron anticuerpos IgG específicos contra

A. suum, los cuales se incrementaron tras la inmunización (183). El extracto crudo de vermes adultos también se administró encapsulado en liposomas y con levamisol como adyuvante, proporcionando una protección cercana al 90 % frente a la migración larvaria en la infección de desafío (184). El empleo de antígenos menos complejos, como fracciones proteicas de fluido pseudocelómico de vermes adultos emulsionadas en adyuvante incompleto de Freund, tuvo como resultado una reducción de hasta el 56 % en el número de lesiones en el hígado y de hasta el 93 % en el número de larvas migratorias en los pulmones en los cerdos inmunizados (185). La inmunización de cerdos con una malato deshidrogenasa purificada de vermes adultos de *A. suum* mezclada con adyuvante completo de Freund estimuló la producción de anticuerpos específicos (186).

A comienzos del siglo XXI, se empezaron a utilizar proteínas recombinantes de *A. suum* en los ensayos vacunales. Ratones y/o cerdos inmunizados con las proteínas rAs14, rAs16, rAs24 y rAs37, en presencia de diversos adyuvantes (subunidad B de la toxina del cólera, adyuvante completo de Freund o AddaVax), manifestaron una reducción de entre el 49 y el 64 % en el número de larvas en los pulmones (187-191). Un resultado similar se obtuvo al utilizar una enolasa en un modelo de ratón (192). Recientemente, se han producido dos proteínas quiméricas, una en base a los epítomos de las proteínas rAs14, rAs16 y rAs37 y otra basada en epítomos conservados en helmintos con elevada reactividad frente a sueros hiperinmunes a *A. suum*. Ambas se administraron a ratones combinadas con el adyuvante monofosforil lípido A, mostrando una reducción de en torno al 73 y al 50 %, respectivamente, en el número de larvas en los pulmones, así como una disminución en la inflamación pulmonar (193,194). La inmunización con las proteínas recombinantes mencionadas provocó, en todos los casos, un aumento en los niveles de IgG en suero (187-194). Muchos de estos ensayos aportaron, además, datos sobre citocinas, observándose un incremento en los niveles de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 en los animales inmunizados (188-192,194). Por consiguiente, la respuesta inmune inducida por la vacunación se asoció, bien con una respuesta de tipo Th2, bien con una respuesta mixta Th1-Th2 (187-191,194).

2.7.2.2. Control biológico

Otra estrategia de control alternativa al tratamiento farmacológico consiste en el control biológico del parásito. En los últimos años, diversos estudios han puesto de manifiesto el potencial antihelmíntico contra *A. suum* de algunas plantas, hongos y

bacterias. Así, se ha observado que mezclas de aceites esenciales de origen vegetal agregadas a la comida de cerdos reducen en ellos el número de vermes adultos del parásito y de huevos en las heces (195). Extractos de la achicoria común (*Cichorium intybus*), de la harina de karité (*Vitellaria paradoxa*), de la cáscara de granada (*Punica granatum*), de la corteza de pino (*Pinus* sp.) o de la flor de trébol blanco (*Trifolium repens*), entre otras plantas, han mostrado capacidad para reducir la motilidad, migración y/o supervivencia *in vitro* de los estadios larvarios L3 y L4 del parásito (196-199). Extractos de otras plantas, como el ajo (*Allium sativum*) o el calabacín (*Cucurbita pepo*), inhiben el desarrollo de huevos del parásito *in vitro* (200). Asimismo, los hongos *Pochonia chlamydosporia*, *Clonostachys rosea* y *Trichoderma atrobrunneum* tienen actividad ovicida contra *A. suum* (201,202). La bacteria *Bacillus thuringiensis* ha demostrado tener un efecto deletéreo sobre el parásito *in vitro*, al reducir la motilidad de las L4 y la supervivencia de los vermes adultos, e *in vivo*, disminuyendo considerablemente el número de L4 en el intestino delgado de cerdos infectados experimentalmente con *A. suum* (203,204).

2.7.3. Prácticas de manejo en las granjas

Una vez que *A. suum* está presente en una explotación, puede dispersarse fácilmente por toda su extensión con el desplazamiento de los animales y el transporte de materiales contaminados (82). Unas prácticas de manejo eficaces y unas condiciones de higiene adecuadas son esenciales para reducir la presión de la infección por este parásito en las explotaciones porcinas, y más aún cuando no existe un tratamiento antihelmíntico o la aplicación de este se realiza de forma incorrecta (205,206). Así, existen numerosos aspectos relacionados con la gestión de una explotación que pueden ser clave en la distribución, prevalencia e intensidad del parásito en ella (82).

La limpieza frecuente y apropiada de los establos es indispensable para eliminar o reducir la presencia de huevos del parásito en las instalaciones (82). Otras prácticas, como disminuir el contacto entre los animales y sus excrementos, hacer un manejo y procesamiento adecuados del estiércol, aplicar esquemas de rotación de pastos en sistemas de cría de cerdos al aire libre y aumentar la precaución al importar cerdos de explotaciones externas, son esenciales para conseguir dicho objetivo (206-209). Otro factor a tener en cuenta es el sistema de producción. Generalmente, los sistemas de ganadería intensiva presentan menor diversidad e intensidad de helmintos parásitos que los sistemas de ganadería extensiva, los cuales muestran mayores prevalencias de *A. suum*

(208,210). Sin embargo, los inconvenientes que presenta la ganadería industrial (cuestionable bienestar animal y uso de medicamentos) están provocando la aparición de sistemas ecológicos caracterizados por una mayor calidad de vida de los animales (crianza al aire libre y acceso a



Figura 10. Cerdos ibéricos criados al aire libre alimentándose de hierba y bellotas en una parcela situada en la provincia de Salamanca (España).

mejores áreas de descanso), peores condiciones de higiene y la ausencia de profilaxis, constituyendo estos últimos ambientes más favorables para los parásitos (205,209) (Figura 10).

2.8. Implicación sanitaria y económica de la ascariosis porcina

La ascariosis desencadena una serie de procesos fisiopatológicos en los cerdos que tienen un impacto negativo sobre la salud y el rendimiento de los animales parasitados, generando, a su vez, importantes pérdidas económicas en la industria porcina. Todo ello depende del nivel de exposición del hospedador al parásito, del estadio de la infección y del estado inmunitario, nutricional y fisiológico del cerdo, entre otros factores. Parte de estas pérdidas se deben a la disminución de la eficiencia de la producción por la reducción del consumo de alimento, de la eficiencia de conversión de dicho alimento y, consecuentemente, de la ganancia de peso del cerdo infectado. Pese a que resulta difícil diferenciar los efectos asociados a *A. suum* de los ocasionados por infecciones parasitarias múltiples, las cuales afectan con frecuencia al ganado porcino, se han obtenido algunos datos que ofrecen una visión general de las consecuencias que esta parasitosis tiene sobre el rendimiento de los cerdos (81). Así, Forsum *et al.* (95) observaron una reducción del 28 % en el consumo de alimento diario de cerdos infectados experimentalmente con *A. suum* y Urban *et al.* (211) hallaron una disminución del 21 % en la ganancia de peso en cerdos no tratados expuestos de forma natural al parásito, frente al grupo tratado con

antihelmínticos. Asimismo, disminuye la calidad del producto cárnico. Por ejemplo, se ha señalado que cerdos infectados de forma natural con *A. suum* presentan una reducción del 4 % en el tamaño del jamón y un incremento de la relación grasa-carne. También existen pérdidas asociadas al decomiso de órganos, principalmente de hígados afectados por la migración larvaria, que se endurecen y no son adecuados para consumo humano (81).

Además de las pérdidas económicas derivadas directamente de la ascariosis porcina, se producen otros costes indirectos, como los relacionados con el control de la parasitosis, principalmente relativos al uso de antihelmínticos. Entre estos efectos indirectos también se encuentran las pérdidas asociadas al aumento de la susceptibilidad o patogenicidad de infecciones bacterianas y virales (81), así como las producidas por la reducción que *A. suum* provoca en la eficacia a la vacunación contra la bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* (212). La modulación que el parásito ejerce sobre el sistema inmune de su hospedador alteraría los mecanismos requeridos para responder a estos patógenos o para hacer efectiva la vacunación contra ellos (212,213). Este aumento en la patogenicidad se ha observado en coinfecciones porcinas de *A. suum* y la bacteria *Escherichia coli*, en las que también se ha señalado que esta última es transportada desde el intestino hasta los pulmones por las larvas migratorias del parásito (214). Asimismo, la tasa de eliminación de *E. coli* de pulmones que presentan larvas de *A. suum* disminuye con respecto a aquellos órganos no parasitados (215). En dos modelos de ratón, uno inoculado con la bacteria *Pasteurella multocida* y otro con el virus de la gripe porcina, se ha observado que la migración de las larvas de *A. suum* por los pulmones provoca mayor vulnerabilidad a las infecciones producidas por estos patógenos respiratorios (213,216).

Aunque es difícil valorar el impacto económico asociado a la ascariosis porcina, algunas estimaciones sitúan las pérdidas derivadas de los efectos directos e indirectos de la parasitosis, sin tener en cuenta el decomiso de órganos, en 5-8 € por cerdo, mientras que las pérdidas por hígado desechado serían de en torno a 2,50 € (148). Estas pérdidas son especialmente significativas en aquellas regiones en las que la industria porcina constituye un motor económico importante (81). El cerdo es la segunda carne más consumida en el mundo y la primera en Europa y Asia. Además, se espera que el consumo de este producto se incremente en un 13,1 % para 2030, representando entonces el 34 % del total de proteínas procedentes de fuentes cárnicas (217). Los mayores productores de carne de cerdo en el mundo son China, la Unión Europea y Estados Unidos. España se

encuentra a la cabeza de la Unión Europea, tanto en la cría de cerdos (alrededor de 34,5 millones de animales en diciembre de 2021) como en la producción de carne (5180 toneladas en 2021). Castilla y León ocupa el tercer puesto en los registros nacionales de ambos indicadores, por detrás de Cataluña y Aragón (218).

A las consecuencias económicas hay que añadir los problemas sanitarios que entraña la ascariosis porcina, debido al potencial zoonótico que presenta *A. suum*. Existen varios casos clínicos descritos en humanos que se han atribuido a este parásito. En la mayor parte de ellos no se ha observado que *A. suum* complete su ciclo biológico, dando lugar al denominado síndrome de larva migratoria visceral. Generalmente, estos casos transcurrieron con manifestaciones pulmonares y/o hepáticas, principalmente infiltrados de eosinófilos, así como eosinofilia o niveles elevados de IgE (219-222). Asociados a este mismo síndrome existen algunos casos de encefalopatía y mielitis, como los descritos por Inatomi *et al.* (223) y Umehara *et al.* (224), en los que se detectaron múltiples lesiones cerebrales e inflamación de la médula espinal, respectivamente, con las subsecuentes alteraciones sensoriales y motoras. Recientemente, se ha publicado un caso diagnosticado mediante técnicas moleculares en el que *A. suum* sí completó su ciclo biológico en el hospedador humano (143). La mayor parte de estos casos han sido descritos en personas procedentes de entornos en los que existe ganado porcino, principalmente de Japón. Otros estudios, realizados en Estados Unidos y Dinamarca, al comparar mediante análisis moleculares vermes procedentes de cerdos y humanos, han determinado que infecciones humanas producidas por *Ascaris* tienen el cerdo como fuente de infección (42,43).

2.9. *A. lumbricoides* versus *A. suum*

A. lumbricoides es un parásito que afecta al ser humano y que está estrechamente relacionado a nivel filogenético con *A. suum*. Ambas especies son morfológicamente indistinguibles, presentan ciclos biológicos idénticos (55) y, aunque existe una preferencia de *A. lumbricoides* hacia el hospedador humano y de *A. suum* hacia el hospedador porcino, ambas pueden completar su ciclo biológico en los dos hospedadores (225). Además, se ha observado que existe transmisión cruzada, flujo génico e hibridación entre ellas (28,29,226,227). Todo ello genera profunda confusión y controversia en cuanto a si *A. suum* y *A. lumbricoides* constituyen una única especie o si son dos especies diferentes estrechamente relacionadas a nivel genético. Aunque algunos estudios genéticos arrojan datos que apoyan la primera hipótesis (26,228,229), tienen mayor peso

aquellos que sostienen el segundo supuesto (27,29,35), pues hasta el momento se consideran dos especies diferentes. Dada la similitud entre ambos parásitos y entre sus hospedadores, *A. suum* y las infecciones porcinas que produce representan un excelente modelo para estudiar *A. lumbricoides* y la ascariosis humana (86,98,119,230).

A. lumbricoides es el nematodo intestinal más grande que afecta al ser humano, el geohelminto parásito más prevalente y con una distribución más amplia y uno de los parásitos más abundantes en todo el mundo (55,77,231,232). Según las últimas estimaciones realizadas en 2013, más de 800 millones de personas están infectadas por este parásito y la ascariosis se encuentra entre las ocho causas que afectan a más del 10 % de la población mundial, siendo la única parasitosis presente en dicho *ranking* (233). Las prevalencias más elevadas de la ascariosis humana aparecen en África, Asia y América Central y del Sur (55). En 2010 se estimó que, en 47 países, esta prevalencia excedía el 20 % en al menos una región del territorio (232) (Figura 11). Dado que esta es una helmintiasis transmitida por el suelo, predomina en zonas que presentan condiciones de higiene y saneamiento deficientes, así como un acceso limitado a agua potable, tanto en países en vías de desarrollo como en las zonas más vulnerables de países con más recursos (234) (Figura 12). Actualmente, la ascariosis humana es considerada por la OMS una enfermedad tropical desatendida (6).

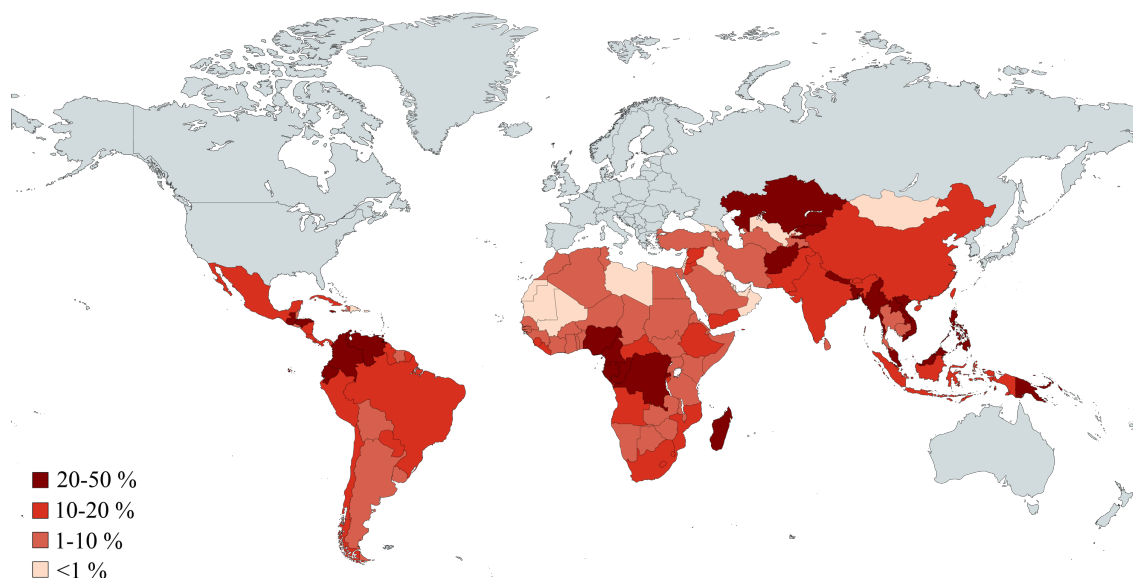


Figura 11. Mapa de distribución de *A. lumbricoides*. Los países endémicos del parásito aparecen coloreados. Las distintas intensidades de color rojo reflejan diferentes intervalos de porcentajes de prevalencia. Los países que se muestran sin colorear corresponden a aquellos que no son endémicos del parásito. Figura creada con mapchart.net. Modificada de (232).

La intensidad de la infección por *A. lumbricoides* en sus hospedadores estaría determinada por factores genéticos, inmunológicos, ambientales y de comportamiento, que aumentan o disminuyen el grado de exposición y predisposición al parásito. Estos mismos factores determinarían la distribución y prevalencia de esta especie en el mundo (55). Generalmente, la prevalencia e intensidad de la infección disminuyen con la edad, por lo que los datos más elevados aparecen en niños y adolescentes, los cuales sufren deficiencias nutricionales, retardo en el crecimiento y alteración del desarrollo físico y cognitivo (230,231,234). A pesar de que la inmunidad adquirida podría favorecer esta variabilidad, otros factores, como diferencias en el comportamiento de niños y adultos, podrían explicar este hecho (235) (Figura 12).



Figura 12. Niño panameño bebiendo agua de una tubería semienterrada en el suelo.

La infección por *A. lumbricoides* es normalmente asintomática o produce síntomas leves no específicos que dependen de la intensidad y de la fase de la infección. Las larvas pueden dar lugar al síndrome de Loeffler, con síntomas como tos, disnea y hemoptisis, apareciendo pleuritis y efusión pleural en raras ocasiones. Los vermes adultos pueden causar abdomen agudo, obstrucción del intestino delgado, vólvulo e intususcepción, especialmente en niños, e invadir orificios, conduciendo a apendicitis, peritonitis, colecistitis, pancreatitis, colangitis, cólico biliar o absceso hepático (Figura 13). En los casos más graves se puede producir perforación del intestino. También pueden alterar la microbiota intestinal. Todo ello conduce a la aparición de síntomas como astenia, falta de apetito, malestar abdominal y diarrea, desencadenando la pérdida de peso. Además, pueden ocasionar sangrado de la mucosa gastrointestinal, dando lugar a anemia. Otros síntomas que pueden aparecer son ictericia, fiebre y sensibilidad abdominal. Al igual que en el caso de la ascariosis porcina, el diagnóstico de la ascariosis humana

requiere la identificación de huevos, larvas o vermes adultos del parásito. Esto se consigue mediante análisis coprológicos, como algunos de los ya citados, exploraciones visuales, como la broncoscopia y la endoscopia y el posterior análisis de las correspondientes muestras pulmonares y gástricas, y técnicas de imagen, como la radiografía, la



Figura 13. Intestino delgado de un niño camerunés de 4 años obstruido por vermes de *A. lumbricoides*. Imagen extraída de (236).

ultrasonografía, la tomografía computarizada y la resonancia magnética. La mayor parte de los casos se resuelven con tratamiento antihelmíntico (principalmente albendazol o mebendazol y, de manera alternativa, ivermectina), el cual provoca la expulsión de los vermes adultos. No obstante, pacientes con obstrucción, vólvulo o intususcepción pueden requerir de laparotomía para retirar dichos vermes y eliminar el tejido gangrenoso (234). A pesar de las cifras tan alarmantes que presenta la ascariosis humana, se estima que entre 1990 y 2013 su prevalencia se habría reducido en más del 25 % gracias a los programas de educación que se están llevando a cabo en muchas zonas desfavorecidas y a la implementación de medidas de higiene y sistemas de agua potable y saneamiento (233,237). En la

actualidad, el control de esta parasitosis recae sobre estos factores, junto con la administración masiva de antihelmínticos (principalmente benzimidazoles), conforme a lo recomendado por la OMS en áreas en las que la prevalencia de *A. lumbricoides* supera el 20 %. Sin embargo, estos programas de desparasitación masiva generan cierta controversia por su cuestionable eficiencia y los problemas que entrañan (234).

3. El sistema hemostático

La estructura general de la pared de los vasos sanguíneos de los vertebrados consta de tres capas concéntricas interconectadas: la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia, que se disponen de este modo desde la luz hacia el exterior del vaso. En la túnica íntima se encuentra el endotelio vascular, formado por una única capa de células endoteliales que recubre la superficie interna del vaso sanguíneo (238). Una de las

principales funciones del endotelio es controlar la fluidez de la sangre, por lo que preservar la integridad de la pared vascular es esencial para garantizar el correcto funcionamiento de los vasos sanguíneos y mantener un estado no trombótico en el organismo (239,240). Además, cuando se produce un daño en un vaso sanguíneo, se origina una hemorragia que es necesario detener para asegurar la supervivencia del organismo (241). El sistema fisiológico responsable de reparar el daño vascular, evitar la extravasación masiva de sangre y restaurar el estado original del vaso sanguíneo es el sistema hemostático (242). Los mecanismos que conforman este sistema se agrupan en dos rutas interrelacionadas, altamente reguladas y equilibradas: el sistema de la coagulación, que permite la formación de un coágulo sanguíneo que repara la pared del vaso dañado, y el sistema fibrinolítico, que conduce a la disolución de dicho coágulo cuando la lesión está reparada, restaurando el estado vascular normal (243).

3.1. El sistema de la coagulación

Cuando un vaso sanguíneo sufre un daño, se produce inmediatamente una vasoconstricción que reduce el flujo de sangre hacia el área lesionada, lo que favorece la formación del coágulo sanguíneo (241). Este coágulo surge como consecuencia de la agrupación de plaquetas sobre la zona dañada y de la deposición sobre ellas de fibrina, proteína filamentosa que proporciona estabilidad al tapón plaquetario (243) (Figura 14). Estas dos fases que conforman el proceso de la coagulación se denominan hemostasia primaria y secundaria, respectivamente, y ambas interaccionan estrechamente (239).

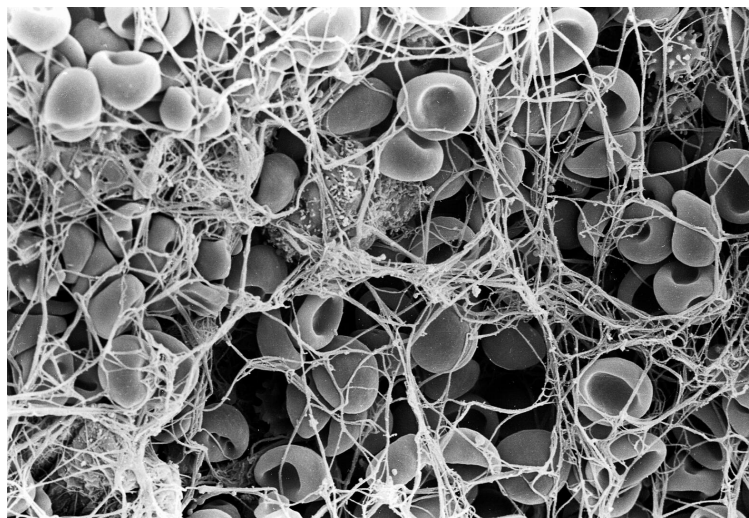


Figura 14. Micrografía electrónica de un coágulo sanguíneo. En él se pueden distinguir los eritrocitos (las células más numerosas y redondeadas), algunos leucocitos (célula con forma estrellada que se observa en la esquina superior derecha) y la red de fibrina. Imagen tomada de (244).

3.1.1. La hemostasia primaria

Tras producirse un daño en la pared de un vaso sanguíneo, las estructuras subendoteliales, entre las que se encuentra el colágeno, quedan expuestas a la sangre (245). El contacto que se produce entre la sangre y estas estructuras desencadena la adhesión de plaquetas al subendotelio (239). La interacción entre las plaquetas y las estructuras subendoteliales puede ser directa o puede estar mediada por el factor de von Willebrand (vWF) (241). Esta proteína, circulante en el plasma sanguíneo, reconoce colágeno y, al unirse a él, se ancla a la pared vascular, lo que provoca un cambio conformacional en su estructura que permite la adhesión de plaquetas (246). La interacción plaqueta-subendotelio promueve la activación de las plaquetas adheridas, las cuales experimentan modificaciones morfológicas que favorecen la secreción de las moléculas que contienen. Estas moléculas facilitan el reclutamiento de plaquetas adicionales, amplifican el proceso de activación y contribuyen a la agregación plaquetaria, también mediada por el vWF (239) (Figura 15). De esta manera, se forma un agregado plaquetario del tamaño necesario para taponar la lesión endotelial, al que también se incorporan eritrocitos y leucocitos circulantes en sangre (243) (Figura 14).

3.1.1.1. El factor de von Willebrand

El vWF es una glicoproteína multimérica sintetizada por las células endoteliales vasculares y los megacariocitos que se almacena intracelularmente en los cuerpos de Weibel-Palade o en los gránulos α , respectivamente, desde los que se secreta a la circulación sanguínea (246). Es sintetizado como un monómero, el cual experimenta modificaciones postraduccionales complejas en el interior de la célula que lo convierten en un conjunto de oligómeros, forma en la que circula en el plasma sanguíneo. Esta composición multimérica es determinante para su función (247). En la hemostasia desempeña dos papeles fundamentales. Por una parte, se encarga de reclutar plaquetas en el sitio del daño vascular, iniciando la hemostasia primaria, y por otra, está implicado en la hemostasia secundaria al actuar como portador del factor VIII (FVIII), evitando su degradación proteolítica y, por tanto, su rápida eliminación de la circulación sanguínea (Figura 15). Además de participar en la hemostasia, el vWF está implicado en procesos de señalización celular, inflamación, angiogénesis, proliferación celular, apoptosis y metástasis (246).

3.1.1.2. Las plaquetas

Las plaquetas son células anucleadas circulantes en sangre que se originan a partir de sus precursores, los megacariocitos. Contienen dos tipos de gránulos (los gránulos α y los gránulos densos), cada uno de los cuales encierra moléculas específicas necesarias para la función plaquetaria (242). Los gránulos α contienen vWF, factores de la coagulación como el fibrinógeno, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) e inhibidor de los activadores del plasminógeno 1 (PAI-1), mientras que en los gránulos densos aparecen nucleótidos como adenosín difosfato (ADP) o adenosín trifosfato (ATP), serotonina y calcio, entre otras moléculas (248). El fibrinógeno es importante en el proceso de agregación plaquetaria, ya que participa en la interacción plaqueta-plaqueta, mientras que los nucleótidos ADP y ATP, la serotonina y el calcio contribuyen a la activación plaquetaria. El tromboxano A₂, eicosanoide sintetizado y liberado por las plaquetas, también es importante en la amplificación de la activación plaquetaria (245). Además, tanto esta sustancia como la serotonina tienen actividad vasoconstrictora. El PDGF estimula la multiplicación de células musculares, lo que podría acelerar la reparación vascular tras la lesión. El calcio participa en la hemostasia secundaria (241).

En su superficie, las plaquetas contienen fosfolípidos, que también desempeñan un papel fundamental en la hemostasia secundaria, y glicoproteínas, las cuales actúan como receptores clave en los procesos de adhesión y agregación plaquetaria, al mediar su unión a proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno, al vWF o al fibrinógeno (239,241). También presentan proteínas transmembrana que intervienen en la activación plaquetaria al actuar como receptores de tromboxano A₂, serotonina o ADP (245).

3.1.1.3. Inhibidores de la hemostasia primaria

La amplificación de los procesos que conducen al reclutamiento de plaquetas debe ser regulada para que el tapón plaquetario se limite únicamente al área del vaso sanguíneo dañada. Las células endoteliales vasculares son las principales responsables de controlar estos procesos al producir potentes inhibidores plaquetarios, como prostaciclina y óxido nítrico, los cuales actúan sobre mensajeros secundarios de las plaquetas (245). La prostaciclina inhibe la adhesión y agregación plaquetarias sobre el endotelio vascular y ambos, tanto la prostaciclina como el óxido nítrico, inhiben la activación plaquetaria y promueven la vasodilatación (241).

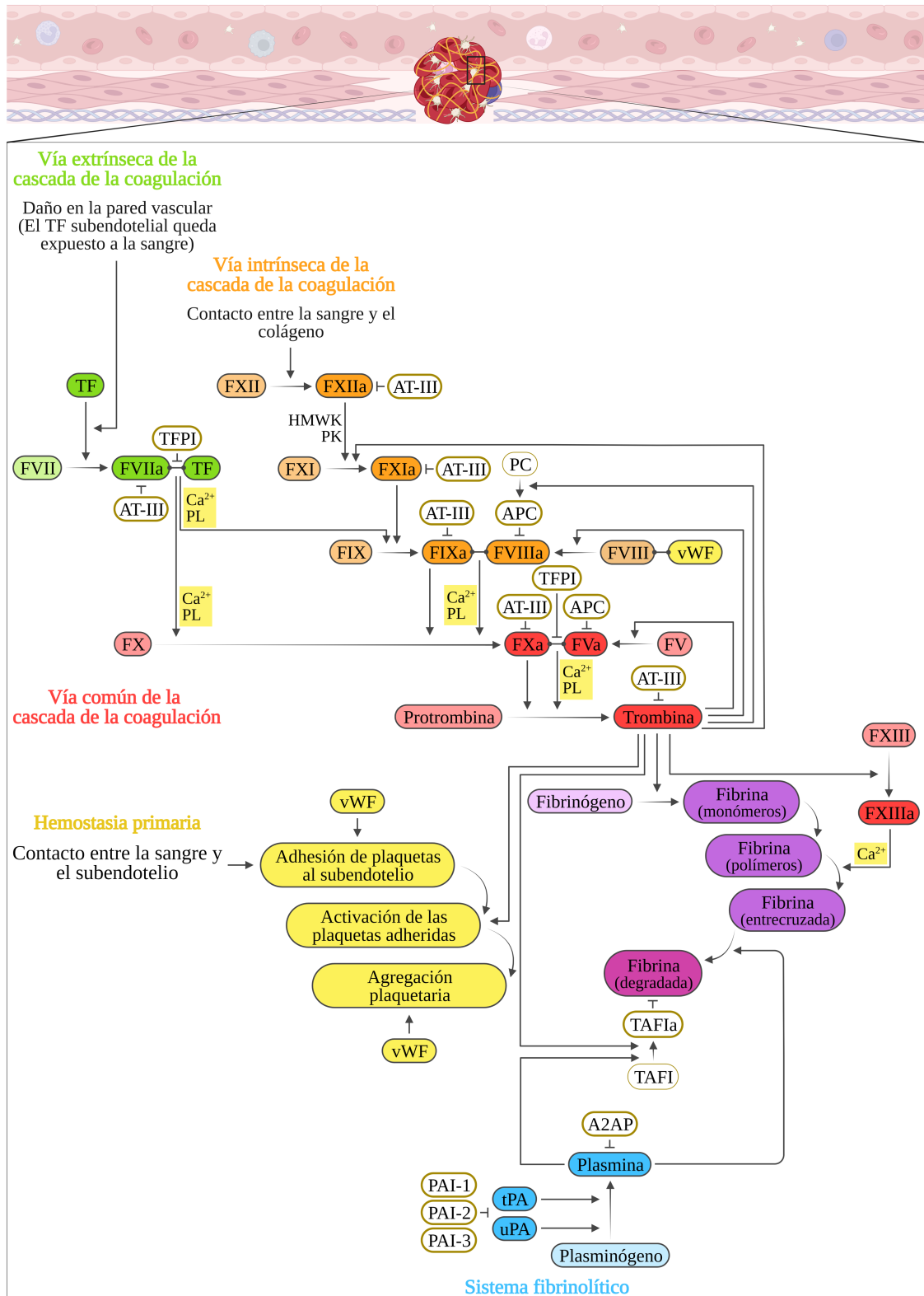


Figura 15. Representación esquemática del sistema hemostático. Se muestran los principales elementos y procesos del sistema, así como las interacciones que se producen entre ellos. En amarillo aparecen aquellos que se engloban dentro de la hemostasia primaria, en verde, naranja y rojo, los correspondientes a las vías extrínseca, intrínseca y común de la cascada de la coagulación (hemostasia secundaria), respectivamente, y en azul, el sistema fibrinolítico. En verde, naranja, rojo y azul claro se representan los zimógenos o formas inactivas de las proteínas, mientras que en sus respectivos colores oscuros se encuentran las enzimas o

proteínas activas. En morado aparecen el fibrinógeno y las distintas formas de la fibrina. En blanco se muestran los principales inhibidores del sistema hemostático. La flecha indica activación, la flecha degradada, transformación, y el símbolo «T», inhibición. La unión de dos factores de la coagulación representa la formación de un complejo. Abreviaturas: vWF, factor de von Willebrand; PL, fosfolípidos; F, factor; a, activado; TF, factor tisular; TFPI, inhibidor de la ruta del factor tisular; AT-III, antitrombina III; PC, proteína C; APC, proteína C activada; HMWK, cininógeno de alto peso molecular; PK, precalicreína; tPA, activador tisular del plasminógeno; uPA, activador del plasminógeno de tipo uroquinasa; PAI, inhibidor de los activadores del plasminógeno; A2AP, α_2 -antiplasmina; TAFI, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina. Figura creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com).

3.1.2. La hemostasia secundaria: la cascada de la coagulación

La fibrina es el producto resultante de la cascada de la coagulación, una serie de reacciones enzimáticas que se producen en cadena en la que diferentes zimógenos, denominados factores de la coagulación, son proteolíticamente convertidos en sus enzimas catalíticamente activas por la acción de factores previamente activados (241). Conforme a los diferentes mecanismos que desencadenan este complejo proceso y con el objetivo de facilitar su estudio, la cascada de la coagulación se divide en dos rutas interconectadas (la vía extrínseca y la vía intrínseca) que convergen en una vía común (249) (Figura 15). Actualmente está descrito que, en un estado fisiológico normal, la responsable de iniciar la cascada de la coagulación es la vía extrínseca, que activa los factores de las vías común e intrínseca necesarios para amplificar la respuesta hemostática. Esta ruta participaría tanto en procesos de hemostasia como de trombosis, relegando el papel de la vía intrínseca iniciada por contacto a procesos trombóticos y procesos defensivos del hospedador frente a patógenos (250).

La vía extrínseca, también denominada vía del factor tisular (TF), se inicia cuando dicho factor queda expuesto a la sangre a nivel subendotelial tras producirse un daño en la pared vascular o tras la activación del endotelio por sustancias químicas, citocinas o procesos inflamatorios (251). El TF, que está anclado a la membrana de distintas células, captura factor VII, mayoritariamente en su forma inactiva (FVII), y lo convierte en su forma activa (FVIIa) (250). Ambos factores forman un complejo enzimático (complejo TF-FVIIa o tenasa extrínseca) en presencia de fosfolípidos y calcio que activa el factor X (FXa) (241,249). La vía intrínseca o vía de contacto puede iniciarse de dos formas distintas. Por una parte, cuando la sangre entra en contacto con una superficie diferente al endotelio vascular cargada negativamente, como el colágeno, lo que produce un cambio conformacional en el factor XII (FXII) que provoca su activación (FXIIa) (242,250,252).

El FXIIa, en presencia de cininógeno de alto peso molecular y precalicreína, activa el factor XI (FXIa) que, a su vez, activa el factor IX (FIXa), el cual da lugar al FXa (250). Por otra parte, la vía intrínseca puede activarse por medio de las rutas extrínseca y común, pues el complejo TF-FVIIa y la trombina tienen capacidad para activar los factores IX y XI, respectivamente, conduciendo a la formación del FXa (242). La activación del factor X como resultado de ambas rutas (extrínseca e intrínseca) constituye el inicio de la vía común. En ella, el FXa convierte la protrombina en trombina, la cual transforma el fibrinógeno soluble en fibrina insoluble (252). La fibrina se genera en forma de monómeros, que se unen de manera espontánea mediante puentes de hidrógeno para dar lugar a polímeros. En presencia de calcio, el factor XIII activado (FXIIIa) por la acción de la trombina es el responsable de estabilizar la fibrina al entrecruzar los polímeros mediante enlaces covalentes (241) (Figura 15).

Sin embargo, en la fase inicial de la cascada de la coagulación, que comprendería aquellos procesos promovidos por el complejo TF-FVIIa, la trombina que se genera es insuficiente para iniciar la polimerización de la fibrina (241). Además, la vía extrínseca es inactivada rápidamente (245). Por estas razones, el proceso de coagulación necesita ser amplificado. Las pequeñas cantidades de trombina que se producen inicialmente conducen a la activación de los factores VIII (FVIIIa) (al liberarlo del complejo no covalente que forma con el vWF [252]) y V (FVa), que no tienen actividad enzimática, pero actúan como cofactores del FIXa y del FXa, respectivamente (241). Estos factores forman sendos complejos enzimáticos (el complejo FIXa-FVIIIa o tenasa intrínseca y el complejo FXa-FVa o protrombinasa) sobre la superficie de fosfolípidos de las plaquetas en una forma dependiente de calcio, los cuales amplifican la generación de trombina y, por tanto, la producción de fibrina. A la amplificación de este proceso también contribuye la activación del factor XI por parte de la trombina generada inicialmente (249) (Figura 15).

Asimismo, la trombina inicial conduce a la activación de plaquetas al interactuar con ciertas glicoproteínas de su superficie, lo que provoca la desgranulación de los gránulos α y la activación de otros receptores plaquetarios (242,249). Esto potencia la agregación plaquetaria e induce la exposición de fosfolípidos cargados negativamente en la superficie celular, los cuales constituyen la principal superficie catalítica sobre la que tienen lugar las reacciones de la cascada de la coagulación (239,249) (Figura 15).

3.1.2.1. Los factores de la coagulación

3.1.2.1.1. El factor tisular

El TF, también denominado tromboplastina o factor III, es una glicoproteína transmembrana que se expresa, mayoritariamente, en células de tejidos vasculares que no se encuentran en contacto directo con la sangre, como células del músculo liso vascular o fibroblastos de la túnica adventicia (242,253). También puede circular en sangre, bien como proteína soluble, bien asociado a células sanguíneas y micropartículas. Además del dominio transmembrana que lo fija a la membrana celular, consta de un dominio citoplasmático que está implicado en la transducción de señales y de un dominio extracelular que participa en la formación del complejo tenasa extrínseco con el FVIIa (253). No solo es esencial en la coagulación sanguínea, sino que también desempeña un papel importante en otros procesos fisiológicos y patológicos, como angiogénesis, embriogénesis, trombosis o inflamación, participando en el desarrollo de afecciones como el cáncer o la enfermedad cardiovascular (254-256).

3.1.2.1.2. Los factores de tipo serina-proteasa

La mayoría de los factores de la coagulación pertenecen al grupo de las proteasas de serina: el FVII, el FIX, el FX, el FXI, el FXII y la protrombina (241). Todos ellos son sintetizados en el hígado por los hepatocitos, desde donde se secretan a la circulación sanguínea (257). Están compuestos por varios dominios que conservan, por lo general, una homología estructural y funcional entre todos ellos. Su actividad enzimática depende de un dominio catalítico que contiene un centro activo que se caracteriza por la tríada compuesta por los aminoácidos serina, ácido aspártico e histidina. La especificidad de sustrato de cada uno de ellos está determinada por las superficies moleculares que rodean este centro activo (245). El cambio conformacional que sufren estas proteasas de serina durante su activación por proteólisis es esencial para la actividad hidrolítica que ejercen sobre los enlaces peptídicos de otras proteínas (258).

Los factores VII, IX y X y la protrombina presentan, además, un dominio rico en ácido γ -carboxiglutámico (dominio GLA) en su extremo aminoterminal (257). La carboxilación de los residuos de ácido glutámico presentes en este dominio, llevada a cabo por la vitamina K, es esencial para la unión de estos factores a las superficies de fosfolípidos donde son activados, por lo que son proteínas dependientes de vitamina K

(242,245). En la protrombina, a continuación del dominio GLA se sitúan dos dominios *kringle*, mientras que en los factores VII, IX y X se encuentran dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (dominio EGF) (257), los cuales parecen estar implicados en la formación de los complejos enzimáticos de los que forman parte estos factores (245). Enlazando estos dominios con el extremo carboxiterminal existe un péptido de activación en el que se encuentra el sitio o los sitios de escisión que permiten la formación de la enzima activa (257).

Los factores XI y XII son diferentes estructuralmente a los descritos anteriormente. El FXI es un homodímero que consta de dos dímeros unidos por puentes disulfuro, cada uno de los cuales contiene cuatro dominios Apple seguidos del péptido de activación y la región carboxiterminal. Por su parte, el FXII es una proteína multidominio que consta de dos dominios EGF, un dominio *kringle*, dos dominios fibronectina y un dominio rico en prolina (257).

3.1.2.1.3. Otros factores

Los cofactores V y VIII son glicoproteínas no enzimáticas sintetizadas en los hepatocitos y las células endoteliales, respectivamente (241,257). Ambos circulan, principalmente, en el plasma sanguíneo. Presentan varios dominios, entre los que se encuentran aquellos que participan en su unión a las membranas de fosfolípidos (257).

El fibrinógeno también es una glicoproteína sintetizada por los hepatocitos y secretada a la circulación sanguínea (241). Tiene una estructura alargada y trinodular. Está formado por tres pares de cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro: dos cadenas A α , dos cadenas B β y dos cadenas γ (259). Los aminoácidos aminoterminales de las cadenas A α y B β forman los fibrinopéptidos A y B, respectivamente. La escisión de estos fibrinopéptidos por la acción de la trombina convierte los polipéptidos A α y B β en cadenas α y β , respectivamente, lo que da lugar a la formación de los monómeros de fibrina (257). El fibrinógeno también es importante en otros procesos aparte de la coagulación sanguínea, como interacciones celulares y matriciales, inflamación y neoplasia (259).

El FXIII es una transglutaminasa que consta de dos subunidades A y dos subunidades B que contienen las regiones transglutaminasa y no catalítica, respectivamente (241,257). Las subunidades A se forman en los megacariocitos y monocitos/macrófagos y las subunidades B se sintetizan en los hepatocitos, asociándose

ambas en el plasma sanguíneo (257). El FXIIIa es responsable de formar enlaces ϵ -(γ -glutamil)-lisina entre los polímeros de fibrina, de manera que produce su entrecruzamiento y estabilización (259).

3.1.2.2. Inhibidores de la cascada de la coagulación

Al igual que ocurre con el tapón plaquetario, es importante que la fibrina se localice únicamente en el área de la lesión vascular. Por tanto, su producción debe estar limitada y, para ello, existen una serie de mecanismos reguladores que actúan a distintos niveles de la cascada de la coagulación (252). Entre ellos destacan el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), la antitrombina III y la proteína C activada (242). Además de estos inhibidores principales, existen otras proteínas que contribuyen a regular dicho proceso, como la α_2 -macroglobulina, que se comporta como un inhibidor secundario de proteasas de amplio espectro, el cofactor II de la heparina, que inhibe la trombina, el inhibidor dependiente de la proteína Z, que actúa sobre el FXa, la proteasa nexina, que inhibe la trombina y el FXa, la α_1 -antitripsina, que inhibe los factores X y XI activados, y el inhibidor de C1, que realiza su función sobre los factores XI y XII activados y la calicreína (249,250,252,260). Todos ellos, excepto la α_2 -macroglobulina, pertenecen al grupo de las serpinas (del inglés *serpins*, *SERine Protease INhibitorS*), una superfamilia de enzimas ampliamente distribuida en los seres vivos que engloba numerosas proteínas que actúan como inhibidores de proteasas de serina (261).

3.1.2.2.1. El inhibidor de la ruta del factor tisular

El TFPI es el principal regulador de la fase inicial de la cascada de la coagulación y el primero en actuar, al inhibir las vías extrínseca y común neutralizando los complejos tenasa extrínseco y protrombinasa, respectivamente (241,251,262) (Figura 15). Se trata de un inhibidor de proteasas de serina de tipo Kunitz que se sintetiza mayoritariamente en las células endoteliales y los megacariocitos, aunque también puede expresarse en otros tipos celulares (262,263). Se produce principalmente en dos isoformas (TFPI α y TFPI β), ambas responsables de inhibir el complejo TF-FVIIa, mientras que el complejo FXa-FVa es inhibido solamente por el TFPI α (262). Estas isoformas constan de dos dominios estructurales de tipo Kunitz que participan en la unión a los factores constituyentes de los complejos que inhiben. El TFPI α presenta, además, un tercer dominio Kunitz que interacciona con la proteína S, la cual actúa como cofactor. Por su

parte, el TFPI β carece de este dominio y, en su lugar, presenta un extremo carboxiterminal modificado que le permite unirse a la superficie de las células en las que se expresa (264).

3.1.2.2.2. La antitrombina III

La antitrombina III es el inhibidor más importante de la coagulación (249). Se trata de una glicoproteína que se sintetiza en el hígado y circula en el plasma sanguíneo (265). Pertenece al grupo de las serpinas y neutraliza todas las proteasas de serina que participan en el proceso de coagulación, de manera que actúa sobre la mayor parte de los factores de la coagulación activados: el FVIIa (dentro del complejo TF-FVIIa), el FIXa, el FXa, el FXIa, el FXIIa y la trombina (242,251,252) (Figura 15). No obstante, su efecto anticoagulante resulta, principalmente, de la inhibición de la trombina y del FXa, el cual es inactivado de manera más eficiente en su forma libre que formando su complejo de activación (242,252). Presenta una estructura que está altamente conservada entre las serpinas, con tres láminas β , nueve hélices α y el bucle del centro reactivo, a través del cual se une a su proteasa diana. Su mecanismo de inhibición implica un cambio conformacional que provoca la deformación de su proteasa diana, especialmente de la tríada catalítica, lo que resulta en la inhibición irreversible de la enzima (266). Su acción está potenciada por cofactores como la heparina y el heparán-sulfato (267). La antitrombina III también presenta actividad antiinflamatoria (265).

3.1.2.2.3. La proteína C activada

La proteína C activada es una proteasa de serina que inactiva de forma irreversible los cofactores V y VIII activados (Figura 15). Es la forma activa de la proteína C, un zimógeno dependiente de vitamina K que circula en el plasma sanguíneo (268). Es sintetizado por el hígado, las células endoteliales vasculares, los queratinocitos y algunas células hematopoyéticas. Tiene una estructura similar al resto de proteasas de serina y es activada en la superficie celular por acción de la trombina (269). Dicha activación requiere de dos receptores transmembrana que son expresados en las células endoteliales: el receptor endotelial de la proteína C y la trombomodulina, que une trombina libre (268). Una vez activada, la proteína C debe separarse de su receptor y unirse a la proteína S, una glicoproteína plasmática también dependiente de vitamina K que actúa como cofactor (252). Aparte de su actividad anticoagulante, la proteína C activada tiene un efecto citoprotector, antiinflamatorio y antiapoptótico, además de funcionar como regenerador al estimular la neurogénesis, la angiogénesis y la cicatrización de heridas (270).

Al unirse a trombomodulina, la trombina sufre un cambio conformacional que elimina su capacidad para actuar sobre el fibrinógeno y activar plaquetas o factores de la coagulación, como el FV o el FXIII (242,245).

3.2. El sistema fibrinolítico

Puesto que la aparición de pequeñas lesiones en el sistema vascular es frecuente, la formación de coágulos sanguíneos que detienen el sangrado se produce de manera constante, los cuales podrían llegar a obstruir la luz del vaso sanguíneo si persistieran tras la reparación del daño (245). Para evitar este hecho y restaurar y mantener la integridad vascular y el equilibrio hemostático después de cualquier lesión, es importante que el coágulo formado sea eliminado una vez que el daño ha sido reparado (242). De esto se encarga la plasmina, enzima central del sistema fibrinolítico que degrada la fibrina que forma parte del coágulo sanguíneo (243).

3.2.1. El plasminógeno y la plasmina

El plasminógeno es el precursor inactivo de la plasmina. Se trata de una glicoproteína que principalmente se sintetiza en el hígado y se secreta a la circulación sanguínea, aunque también puede producirse en otros órganos y encontrarse en fluidos extravasculares (260,271,272). Consta de siete dominios: un dominio PAN/Apple aminoterminal, cinco estructuras homólogas de triple lazo denominadas dominios *kringle* y un dominio serina-proteasa carboxiterminal. Cuatro de los cinco dominios *kringle* contienen sitios de unión a lisina, los cuales median la unión del plasminógeno a los residuos de lisina de la fibrina o de receptores localizados en la superficie de ciertas células (260,272). El plasminógeno, preferentemente tras este proceso de fijación, es convertido en plasmina por la acción de distintos activadores que provocan la rotura del enlace peptídico Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² del plasminógeno (273) (Figura 15). La plasmina generada consta de dos cadenas unidas por puentes disulfuro: una cadena pesada derivada del extremo aminoterminal que contiene los dominios *kringle* y una cadena ligera que alberga el dominio que encierra el centro activo con la tríada catalítica característica de las proteasas de serina (274).

La modificación postraduccional del plasminógeno por glicosilación da lugar a dos variantes denominadas glicofomas I y II del plasminógeno. La porción de carbohidratos de la molécula es la responsable de regular su afinidad por los distintos

receptores (260). De esta manera, cada una de las glicofomas presenta una actividad biológica diferente. La glicofoma I parece ser más importante en la fibrinólisis intravascular, mientras que la glicofoma II tiene mayor afinidad por las superficies celulares (272). En cuanto a su conformación, el plasminógeno adopta dos configuraciones diferentes, cerrada y abierta, siendo esta última la que facilita su activación. La forma circulante del plasminógeno está en conformación cerrada y presenta ácido glutámico en su extremo aminoterminal (Glu-Plg). Cuando el Glu-Plg se une a fibrina o a una superficie celular, adopta una conformación abierta y puede ser convertido en formas modificadas por proteólisis, debido a la acción que ejerce la plasmina sobre algunos de sus puentes peptídicos. Estas formas modificadas también están en conformación abierta y poseen en su extremo aminoterminal los aminoácidos lisina, valina o metionina (comúnmente denominadas Lys-Plg) (272,273,275). Aunque tanto las formas abiertas de Glu-Plg como de Lys-Plg pueden ser convertidas en plasmina por la acción de los activadores del plasminógeno, el Lys-Plg tiene mayor capacidad para unirse a los receptores y ser activada (260,272).

La plasmina, enzima proteolíticamente activa del plasminógeno, es la responsable de degradar el coágulo sanguíneo al producir la lisis de fibrina en productos de degradación de la fibrina, razón por la cual también se denomina fibrinolisisina (242) (Figura 15). Sin embargo, la plasmina es una proteasa de serina cuya especificidad de sustrato no se limita a la fibrina, de manera que también puede participar en otros procesos proteolíticos que no están directamente relacionados con la eliminación de coágulos sanguíneos (276).

3.2.2. Activadores del plasminógeno

Los dos principales activadores del plasminógeno son el activador tisular del plasminógeno (tPA) y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). Otras proteasas, como la calicreína, el FXIa y el FXIIa, también son capaces de activar el plasminógeno en determinadas condiciones, aunque representan un pequeño porcentaje de la actividad generadora de plasmina en el plasma sanguíneo (260).

3.2.2.1. El activador tisular del plasminógeno

El tPA es una glicoproteína sintetizada principalmente por las células endoteliales vasculares, aunque también se expresa en células extravasculares, como neuronas y

células gliales (260,277). Consta de cinco dominios estructurales; en la región aminoterminal contiene un dominio de tipo fibronectina (dominio *finger*), un dominio EGF y dos dominios *kringle* homólogos a los del plasminógeno, mientras que en la región carboxiterminal presenta el dominio serina-proteasa que contiene el sitio activo. Es secretado a la circulación sanguínea como una proteasa de serina de cadena sencilla (sc-tPA), que es convertida en una molécula de cadena doble (tc-tPA) por proteólisis ejercida por la plasmina. Al contrario de lo que sucede con la mayoría de los precursores de proteasas de serina, el sc-tPA es enzimáticamente activo y muestra una actividad similar al tc-tPA cuando está unido a fibrina (260,278).

La activación del plasminógeno mediada por el tPA está implicada, principalmente, en la disolución de fibrina en la circulación sanguínea, ya que se produce preferentemente sobre la fibrina y las células endoteliales vasculares (278,279). El tPA tiene capacidad para unirse a fibrina a través del dominio *finger* y de uno de los dos dominios *kringle*. Los sitios de unión del tPA en la fibrina están próximos a los del plasminógeno, lo que facilita el mecanismo de activación y la formación de un complejo ternario que tiene como resultado el incremento de la eficiencia catalítica del tPA y, por tanto, de la activación del plasminógeno (273,280). Esto sucede porque la afinidad del tPA por el plasminógeno, que es baja en ausencia de fibrina, aumenta considerablemente en su presencia. Así, la fibrina desempeña una función dual, actuando como cofactor de la activación del plasminógeno y como sustrato de la plasmina que se genera. La lisis del coágulo de fibrina inducida por el tPA se produce en dos fases: una inicial en la que el sc-tPA activa el plasminógeno en la superficie de fibrina intacta y una secundaria en la que la plasmina generada degrada parcialmente la fibrina, la cual expone nuevos sitios de unión para el plasminógeno y el tPA (280). El tPA no solo es fundamental en la lisis del coágulo sanguíneo, sino que también es un importante modulador del sistema nervioso central, participando en procesos tanto fisiológicos (plasticidad neuronal, aprendizaje o memoria) como patológicos (neurodegeneración, convulsiones o isquemia cerebral) (281).

3.2.2.2. El activador del plasminógeno de tipo uroquinasa

El uPA es una glicoproteína expresada por numerosos tipos celulares, entre los que se encuentran células del endotelio y del músculo liso vascular, fibroblastos, monocitos/macrófagos, células del epitelio renal y células tumorales (260,282). Consta

de tres dominios estructurales; en la región aminoterminal presenta un dominio EGF y un dominio *kringle* homólogo a los del plasminógeno y el tPA, mientras que en el extremo carboxiterminal contiene el dominio serina-proteasa que presenta la tríada catalítica clásica (278,283). Es secretado a la circulación sanguínea como una proteasa de serina de cadena sencilla (sc-uPA) denominada prouroquinasa (pro-uPA), que se convierte en una molécula de cadena doble (tc-uPA) por escisión de un puente peptídico por acción de la plasmina mayoritariamente, pero también de otras proteasas, como la calicreína (278).

La pro-uPA tiene capacidad para actuar directamente sobre el plasminógeno generando plasmina, aunque es mucho menos activa que el tc-uPA (279). No obstante, únicamente la pro-uPA induce la lisis del coágulo de fibrina en el plasma sanguíneo, principalmente cuando el plasminógeno está unido a residuos de lisina carboxiterminales en la fibrina parcialmente degradada. Cuando el plasminógeno está unido a residuos de lisina internos en la fibrina intacta o en ausencia de fibrina, la pro-uPA no activa el plasminógeno. Dado que el dominio *kringle* del uPA no contiene sitio de unión a lisina, este activador no se une a fibrina (273). A pesar de que el uPA tiene mucha menor afinidad por la fibrina que el tPA, es eficiente tanto en presencia como en ausencia de la misma (260). Por ello, la activación del plasminógeno mediada por el uPA está implicada, principalmente, en proteólisis pericelular, participando en procesos como la remodelación tisular, la ovulación, la implantación del embrión o la angiogénesis (273,279). De esta manera, el uPA tiene un papel relevante en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, la aterosclerosis o la artritis reumatoide (284-286).

El uPA se une a un receptor específico denominado uPAR, una proteína que está anclada a la membrana plasmática de determinados tipos celulares a través de restos glicosilfosfatidilinositol. Este receptor se localiza en la superficie de monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y diversas células tumorales (260). La unión del uPA al uPAR, que se produce a través del dominio EGF del uPA, parece ser crucial para su actividad, ya que provoca un incremento en la generación de plasmina (278,283). Esto se origina como consecuencia del aumento tanto en la activación del plasminógeno como en la transformación de la pro-uPA en el tc-uPA por la plasmina generada, ambos efectos dependientes de la unión del plasminógeno a células (278).

3.2.3. Inhibidores de la fibrinólisis

La inhibición del sistema fibrinolítico puede producirse a nivel de los activadores del plasminógeno o de la plasmina, principalmente por los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI) y por la α_2 -antiplasmina, respectivamente (278) (Figura 15). En la inhibición de la plasmina también interviene la α_2 -macroglobulina, cuando la concentración de plasmina excede la capacidad de inhibición de la α_2 -antiplasmina (252). Otros inhibidores de la fibrinólisis son la α_1 -antitripsina, el inhibidor de C1, el complejo trombina-trombomodulina, la neuroserpina, la proteasa nexina y el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) (260,273).

3.2.3.1. Los inhibidores de los activadores del plasminógeno

Se distinguen tres tipos de PAI (PAI-1, PAI-2 y PAI-3), todos ellos glicoproteínas pertenecientes a la superfamilia de las serpinas (279). El PAI-1 es el inhibidor fisiológico más importante de los activadores del plasminógeno y el que actúa más rápidamente (260). Se sintetiza en una gran variedad de tipos celulares, como células endoteliales, células del músculo liso vascular, fibroblastos, plaquetas y monocitos/macrófagos, entre otros, y circula en el plasma sanguíneo (279,287,288). Presenta características estructurales comunes a la mayoría de las serpinas. Su mecanismo de inhibición se basa en la formación de un complejo estable con su proteína diana que implica un cambio conformacional en su estructura que deforma el centro activo de la proteasa (289). Debido a su interacción con el uPA, receptores de la superficie celular y ligandos biológicos como la vitronectina, el PAI-1 está implicado en otros procesos fisiológicos, como proteólisis pericelular, remodelación tisular y migración celular. Por ello, este inhibidor se ha relacionado con el desarrollo de afecciones como el cáncer y enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y neurodegenerativas (290). Aunque el PAI-2 se encuentra en diferentes tejidos, solamente se detecta en el plasma de mujeres embarazadas, por lo que se cree que es esencial para mantener la hemostasia durante la gestación. Por su parte, el PAI-3 se sintetiza en el hígado y otros órganos, y se puede encontrar en plasma, orina y fluidos seminales y foliculares (279).

3.2.3.2. La α_2 -antiplasmina

La α_2 -antiplasmina es el principal inhibidor fisiológico de la plasmina. Es una glicoproteína perteneciente al grupo de las serpinas que se expresa principalmente en el

hígado y circula en el plasma sanguíneo (291). Posee una estructura conservada dentro de las serpinas y consta de dos prolongaciones, una de las cuales posee residuos de lisina. Su mecanismo de inhibición comprende dos fases: una inicial en la que se produce la unión reversible entre ambas moléculas por medio de la interacción entre los residuos de lisina de la extensión carboxiterminal de la α_2 -antiplasmina y los sitios de unión a lisina de los dominios *kringle* de la plasmina y una secundaria que implica la formación de un complejo de unión irreversible (292). La α_2 -antiplasmina se une más rápidamente a la plasmina en su forma libre que cuando está unida a fibrina, ya que ambos, inhibidor y sustrato de la plasmina, interaccionan con los mismos sitios de unión, los cuales están ocupados en la plasmina fijada a fibrina (252). Por ello, la plasmina unida a fibrina está protegida de su rápida inactivación por la α_2 -antiplasmina (278).

3.2.3.3. El inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina

El TAFI es una glicoproteína perteneciente a la familia de las metalocarboxipeptidasas que se sintetiza, de forma mayoritaria, en el hígado, aunque también es producida en los megacariocitos (260,293). Circula como proenzima en el plasma sanguíneo hasta que es transformada en su forma activa (TAFIa) por la escisión de un puente peptídico por la acción de distintos activadores. Entre ellos, el activador de mayor eficiencia catalítica es el complejo trombina-trombomodulina, seguido de la plasmina y, finalmente, de la trombina. El TAFIa actúa sobre la fibrina parcialmente degradada retirando residuos de lisina carboxiterminales, de manera que disminuye el número de sitios de unión disponibles para el plasminógeno y el tPA, reduciendo así la formación de plasmina y atenuando la fibrinólisis (294). Esto permite estabilizar el coágulo sanguíneo y protegerlo de la degradación prematura por la plasmina (242). Por ello, más que un inhibidor, el TAFI es considerado un atenuador de la ruta fibrinolítica (260).

3.2.4. Receptores del plasminógeno. Otras funciones de la plasmina

Algunos tipos celulares, entre los que se encuentran células endoteliales, epiteliales, tumorales y todas las células sanguíneas excepto los eritrocitos, tienen capacidad para unir el plasminógeno a través de proteínas expresadas en su superficie (260,276). Entre las proteínas mejor caracterizadas como receptores del plasminógeno se hallan la α -enolasa, la anexina 2, la actina, la glicoproteína plaquetaria GPIIb/IIIa, las integrinas $\alpha_M\beta_2$ y $\alpha_5\beta_1$, la histona H2B, la citoqueratina 8, la anfoterina, la proteína

TIP49a, el antígeno GP330 de la nefritis de Heymann y el receptor del plasminógeno KT (Plg-R_{KT}) (295).

La plasmina resultante de la activación del plasminógeno, bien unido a fibrina, bien fijado a estos receptores celulares, puede ejercer su actividad proteolítica sobre una amplia variedad de sustratos aparte de la fibrina. Entre ellos se incluyen proteínas de la matriz extracelular, como la laminina y la fibronectina, metaloproteasas de matriz (MMP), como la MMP1 y la MMP3, proteínas que intervienen en las respuestas inmune e inflamatoria, como C3 y el componente 5 del complemento (C5), factores de la coagulación, como el fibrinógeno o los factores V, VIII y X, proteínas implicadas en procesos de adhesión celular, como la vitronectina, o de proliferación y migración celular, como la tenascina C, y hormonas y factores de crecimiento (260,272,276). Como se ha mencionado anteriormente, la plasmina también actúa sobre el tPA y el uPA, transformándolos en moléculas de cadena doble más activas, de manera que crea una retroalimentación positiva sobre su propia activación (260).

La interacción que se produce entre el plasminógeno y las superficies celulares se asemeja a la que se establece entre el plasminógeno y la fibrina. Por una parte, los receptores identificados presentan residuos de lisina en su extremo carboxiterminal que interaccionan con los sitios de unión a lisina de los dominios *kringle* del plasminógeno. Por otra, muchas de las células fijadoras del plasminógeno unen, además, activadores del plasminógeno, de manera que localizan la actividad fibrinolítica en su superficie y promueven así la producción de plasmina. La plasmina generada sobre las superficies celulares puede participar en la lisis de la fibrina cuando las células portadoras de los receptores del plasminógeno se encuentran próximas a la fibrina (295). Sin embargo, dado que los receptores celulares del plasminógeno están implicados en numerosos procesos fisiológicos y patológicos y que la actividad proteolítica de la plasmina se produce sobre muchos sustratos, la función principal de esta enzima en su forma asociada a células no está relacionada con la lisis de coágulos sanguíneos (276,296,297). De este modo, la plasmina desempeña un papel importante en la cicatrización de heridas, la remodelación tisular, la angiogénesis, la inflamación o en procesos de adhesión, proliferación, migración e invasión celular (272,276,298), constituyendo un factor clave en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, la artritis, el asma, la soriasis, enfermedades cardiovasculares o enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas (298-300).

HiPÓTESiS Y OBJETiVOS

Comprender las relaciones parásito-hospedador es esencial para desarrollar herramientas que resulten efectivas en el tratamiento y control de las helmintiasis. En este tipo de asociaciones juegan un papel fundamental las diferentes estrategias que los parásitos han desarrollado para aprovechar los recursos fisiológicos de su hospedador. La investigación realizada en las últimas décadas ha puesto de manifiesto que una de estas estrategias podría estar relacionada con la manipulación del sistema hemostático. Sin embargo, la información disponible en este campo de estudio se encuentra dispersa en numerosos artículos y revisiones literarias y ha de ser revisada de manera sistemática para poder diseñar investigaciones de forma más racional. En este contexto, el primer objetivo de la presente Tesis Doctoral es:

1. Realizar una revisión de alcance sobre la interacción molecular entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados para revisar, sintetizar y unificar sistemática y homogéneamente la evidencia publicada en este campo, actualizar conceptos e identificar vacíos de conocimiento, impulsando la generación de nuevas investigaciones.

Entre los helmintos parásitos se encuentra *Ascaris suum* que, pese a ser considerado un parásito intestinal debido a que su fase adulta se localiza en dicho órgano del hospedador, parte de su ciclo biológico transcurre por la circulación sanguínea, gracias a la migración que lleva a cabo su larva infectiva de tercer estadio. La sangre podría constituir un ambiente hostil para dicha larva, pues la formación de coágulos podría comprometer su supervivencia durante la migración y, por tanto, el establecimiento del parásito en el hospedador. Teniendo en cuenta esta premisa, nuestra hipótesis es que la larva de tercer estadio de *A. suum* tiene potencial para inhibir la cascada de la coagulación de su hospedador y activar su sistema fibrinolítico. Para demostrar dicha hipótesis, se planteó el segundo objetivo de la Tesis Doctoral, que es:

2. Estudiar la capacidad de la larva de tercer estadio de *A. suum* para interactuar con el sistema hemostático de su hospedador mediante el análisis y la caracterización del potencial de dicha fase evolutiva para inhibir la cascada de la coagulación y activar el sistema fibrinolítico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Revisión de alcance sobre la interacción molecular entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados

1.1. La revisión de alcance

Las revisiones de alcance constituyen una herramienta sistemática, transparente, replicable y conveniente para localizar y registrar la literatura científica de un campo de investigación en relación a su naturaleza, características y volumen. Consisten en la búsqueda, selección, revisión, análisis y visualización sistemáticas de la información contenida en un área de estudio. De este modo, proporcionan una perspectiva general de la evidencia disponible al sintetizar el conocimiento existente e identificar los principales conceptos, teorías y vacíos de conocimiento (301-304).

1.2. Protocolo y criterios de elegibilidad

La revisión de alcance recogida en la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo siguiendo las directrices marcadas por la declaración PRISMA-ScR (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses extension for Scoping Reviews), publicada por Tricco *et al.* (304). En primer lugar, se establecieron las condiciones que determinaron la selección de las publicaciones que formaron parte de la revisión (fuentes de evidencia). La primera de estas condiciones fue que todas las fuentes de evidencia debían ser manuscritos sujetos a revisión académica por pares publicados antes del 1 de enero de 2020. Seguidamente, se fijaron siete criterios adicionales para determinar su elegibilidad: (i) tenían que estar escritas en inglés; (ii) debían ser artículos de investigación originales (se excluyeron del estudio las revisiones, metanálisis, libros, casos clínicos, ensayos clínicos, comentarios, editoriales, cartas, conferencias y manuales, entre otros); (iii) su título y resumen tenían que enmarcarse en el ámbito de la revisión (debían estudiar interacciones entre helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados); (iv) debían tener acceso al texto completo de la publicación; (v) tenían que estudiar interacciones moleculares a través de ensayos *in vitro* o *ex vivo* (los resultados obtenidos en experimentos *in vivo* no se incluyeron); (vi) debían estudiar interacciones entre helmintos parásitos y los principales componentes del sistema hemostático de los vertebrados (revisados en Arnout *et al.* [239] y recogidos en el

apartado 1.3 de la presente sección); (vii) tenían que demostrar empíricamente la interacción (se excluyeron de la revisión aquellos resultados que estudiaban o sugerían la interacción sin una base experimental). El término «interacción» se empleó para referirse a cualquier evento asociativo, específico y propositivo, sujeto a fuerzas biomoleculares, entre dos moléculas, según la definición proporcionada por Sharma *et al.* (305). Finalmente, se eliminaron aquellos artículos que no aportaron datos adicionales a los proporcionados por trabajos previamente publicados e incluidos en la revisión.

1.3. Búsqueda de literatura y selección de las fuentes de evidencia

La búsqueda de literatura para identificar publicaciones relevantes para la revisión de alcance se llevó a cabo en dos bases de datos electrónicas: PubMed y Web of Science Core Collection. Para diseñar las estrategias de búsqueda para cada una de ellas, se seleccionaron múltiples palabras clave relacionadas con los helmintos parásitos (*parasite, helminth, worm, nematode, platyhelminth, trematode, cestode*) y los principales componentes del sistema hemostático de los vertebrados (*haemostasis o haemostatic system, coagulation, platelet, vWF, TF, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIII, prothrombin, thrombin, fibrinogen, fibrin, TFPI, antithrombin, protein C, fibrinolysis o fibrinolytic system, plasminogen, plasmin, tPA, uPA, PAI-1, PAI-2, antiplasmin*) (revisado en Arnout *et al.* [239]) y se combinaron mediante los operadores de búsqueda (operadores Booleanos) «AND» y «OR». Dado que PubMed posee tesauro (diccionario o conjunto ordenado de los términos que se utilizan para describir, clasificar e indexar las publicaciones de una base de datos), a la estrategia de búsqueda para esta base de datos se incorporaron descriptores, que en este caso fueron términos pertenecientes al vocabulario MeSH (Medical Subject Headings). Las estrategias de búsqueda diseñadas para cada una de las bases de datos se encuentran en el Anexo II. Los resultados de la búsqueda se exportaron a un archivo Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, EEUU) donde posteriormente se eliminaron aquellos registros que aparecían duplicados en las dos bases de datos. Finalmente, se seleccionaron las fuentes de evidencia siguiendo los criterios de elegibilidad descritos en el apartado anterior. Tanto la búsqueda como la selección de las fuentes de evidencia fue realizada por dos investigadores de manera independiente, requiriéndose concordancia entre ellos en cada etapa del proceso y, si

surgió cualquier disconformidad, esta se resolvió consultando a un tercer investigador para evitar la aparición de sesgos.

1.4. Registro y análisis de los datos

La información relevante para la revisión de alcance contenida en las fuentes de evidencia seleccionadas se registró en un archivo Microsoft Excel, siguiendo un protocolo estandarizado diseñado para este estudio que se recoge en el **Anexo III**. La información extraída de los documentos seleccionados incluyó datos sobre el artículo (número de acceso a la base de datos correspondiente, referencia bibliográfica abreviada, año de publicación), el parásito responsable de la interacción (especie, estadio, material parasitario, descripción del material parasitario, compartimento del material parasitario) y la interacción parásito-hospedador (tipo de interacción, componente del sistema hemostático con el que se produce, técnica con la que se estudia, molécula/s del parásito identificada/s como responsable/s de la interacción, técnica que permite la identificación, ruta del sistema hemostático con la que se produce la interacción, efecto que se le atribuye en relación a la formación o disolución de coágulos sanguíneos en el hospedador, proceso biológico que se le atribuye, validación del proceso biológico atribuido). Estos datos fueron extraídos por dos investigadores de forma independiente, entre los que se requirió de conformidad y, si surgió cualquier discordancia, se consultó a un tercer investigador. Por último, los datos extraídos se analizaron y visualizaron empleando las herramientas ofrecidas por Microsoft Excel.

2. Estudio de la interacción entre la larva de tercer estadio de *Ascaris suum* y el sistema hemostático de su hospedador

2.1. Obtención del material biológico

2.1.1. Obtención de las larvas de tercer estadio de *A. suum*

Las larvas de tercer estadio de *A. suum* (L3As) se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Vlaminc *et al.* (306) con algunas modificaciones. En primer lugar, vermes adultos de *A. suum* procedentes de intestinos de cerdos infectados de forma

natural fueron proporcionados por un matadero perteneciente a la Sociedad Cooperativa Chacinera Albercana, situado en la provincia de Salamanca (España). Teniendo en cuenta los rasgos morfológicos característicos del dimorfismo sexual de *A. suum* (60), se seleccionaron únicamente las hembras, las cuales se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) (7,5 mM fosfato disódico [Na₂HPO₄]; 3,3 mM bifosfato de sodio [NaH₂PO₄]; 145 mM cloruro de sodio [NaCl]; pH 7,2) y se abrieron longitudinalmente para practicarles la histerectomía. Los úteros extirpados se lavaron con PBS y de ellos se extrajeron manualmente los huevos, los cuales se suspendieron en el mismo tampón. Posteriormente, el PBS se retiró mediante centrifugación a 200 x g durante 5 min y, a continuación, los huevos se resuspendieron en una solución de dicromato potásico (K₂Cr₂O₇) diluido en PBS al 2 % masa-volumen (m/v) (proporción 4:1 volumen-precipitado [V/P]), la cual actuó como agente oxigenante y antimicrobiano. Por último, los huevos se distribuyeron en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning, Nueva York, EEUU), formando una monocapa en el fondo del pocillo, y se incubaron durante aproximadamente 40 días a 27 °C con iluminación natural limitada. El proceso de incubación se monitorizó observando los huevos al microscopio óptico (DM IL y DM IRB, Leica, Wetzlar, Alemania). Durante este tiempo, los pocillos se fueron rellenando con dicromato potásico a medida que este se fue evaporando.

Una vez transcurrido ese tiempo, los huevos se transfirieron de las placas de cultivo a tubos de ensayo (Falcon, Nueva Jersey, EEUU). Dichos tubos se centrifugaron a 200 x g durante 5 min para retirar el dicromato potásico y, a continuación, se trataron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 5-6 % (m/v) (lejía comercial) (proporción 4:1 V/P) durante 15 min a 37 °C, agitando cada 5 min para favorecer la eliminación de la cubierta externa del huevo. Posteriormente, se realizaron al menos 5 lavados con PBS a 37 °C (proporción 4:1 V/P), seguidos de la correspondiente centrifugación a 200 x g durante 5 min, para retirar los posibles restos de dicromato potásico e hipoclorito de sodio que pudieran contener. Tras realizar el último lavado, los huevos se dejaron suspendidos en PBS (proporción 3:1 V/P). La suspensión resultante se transfirió a un matraz Erlenmeyer que contenía una capa de perlas de vidrio y una barra de agitación magnética y se mantuvo en agitación suave durante aproximadamente 1 h (60 x rpm) para inducir la eclosión de los huevos. El proceso de eclosión se monitorizó mediante observación al microscopio óptico. Cuando la mayor parte de las larvas se encontraron fuera del huevo, estas se separaron del resto del material parasitario utilizando la técnica de Baermann descrita por

Urban *et al.* (307). Para ello, la suspensión se vertió sobre una capa de gasa y algodón (2,5 g) colocada sobre un embudo que contenía PBS en su cuello, y se mantuvo durante toda la noche a 37 °C en una atmósfera humidificada en presencia de 5 % CO₂ con iluminación limitada. A la mañana siguiente, se recogieron las L3As vivas que habían migrado hasta el cuello del embudo y se lavaron con PBS centrifugando a 200 x g durante 5 min. Una parte de ellas fue fijada en formaldehído (CH₂O) diluido en PBS al 10 % volumen-volumen (v/v) para su posterior utilización. El resto se emplearon para obtener los extractos parasitarios que se describen a continuación.

2.1.2. Obtención de los extractos de proteínas de la superficie y de los productos excretores/secretores de las larvas de tercer estadio de *A. suum*

Para llevar a cabo la mayor parte de los ensayos experimentales contenidos en la presente Tesis Doctoral, se emplearon dos tipos de extractos parasitarios: el extracto de proteínas de la superficie y el extracto de los productos excretores/secretores.

2.1.2.1. Obtención del extracto de superficie de las L3As

El extracto de superficie de las L3As (L3AsS) se preparó siguiendo la metodología descrita por Wedrychowicz *et al.* (308) con escasas modificaciones. Las L3As se incubaron en una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (C₁₉H₄₂BrN) diluido en PBS al 0,25 % (m/v), a la que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (1 mM ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] [C₁₀H₁₆N₂O₈]; 1 mM N-etilmaleimida [NEM] [C₆H₇NO₂]; 1 μM pepstatina A [C₃₄H₆₃N₅O₉]; 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo [PMSF] [C₇H₇FO₂S]; 0,1 mM tosil-fenilalanina-clorometil cetona [TPCK] [C₁₇H₁₈ClNO₃S]) (309), durante 4 h a 37 °C en agitación suave. A continuación, esta suspensión se centrifugó a 200 x g durante 5 min para retirar las larvas y obtener el sobrenadante, el cual se pasó a través de un filtro de 0,22 μm (Millex, Carrigtwohill, Irlanda) para eliminar las posibles larvas restantes que pudiera contener. Las proteínas presentes en dicho sobrenadante se precipitaron con la adición de una solución 0,002 M de acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) y 9 volúmenes de etanol (C₂H₆O) al 96 % (v/v), mantenida durante 48 h a -20 °C. Finalmente, y tras centrifugar a 10 000 x g durante 10 min, el sedimento resultante se resuspendió en PBS.

2.1.2.2. Obtención del extracto excretor/secretor de las L3As

El extracto excretor/secretor de las L3As (L3AsES) se preparó siguiendo la metodología empleada por González-Miguel *et al.* (310) con escasas modificaciones. Las L3As vivas se mantuvieron en placas de cultivo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU) con medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) suplementado con una solución antibiótica-antimicótica 100X (Sigma-Aldrich) durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, la suspensión resultante se centrifugó a 200 x g durante 5 min para retirar las larvas y obtener el sobrenadante, el cual se pasó a través de un filtro de 0,22 µm para eliminar las posibles larvas restantes que pudiera contener, y se suplementó con un cóctel de inhibidores de proteasas (1 mM EDTA; 1 mM NEM; 1 µM pepstatina A; 1 mM PMSF; 0,1 mM TPCK) (309). Después, el sobrenadante se dializó frente a agua ultrapura durante 48 h a 4 °C en agitación empleando una membrana de diálisis (SnakeSkin Dialysis Tubing, Thermo Fisher Scientific), y los productos parasitarios excretores/secretores presentes en la solución resultante se concentraron usando filtros centrífugos (Amicon Ultra-15, Millipore, Burlington, EEUU), siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante.

Una vez preparados ambos extractos, se midieron sus concentraciones proteicas empleando el kit BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el patrón de bandas de proteína de cada fracción se visualizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) antes de ser almacenados a -80 °C hasta su posterior utilización.

2.1.3. Obtención de plasma de cerdo

Para realizar los ensayos anticoagulantes que se describen en el siguiente apartado, fue necesario obtener plasma de cerdo. Para ello, muestras de sangre de cerdos en los que no se evidenció la presencia de *A. suum* tras la examinación *post mortem* de las vísceras de los animales fueron proporcionadas por el matadero anteriormente citado. La sangre fue recogida en tubos de plástico estériles en presencia de 0,106 M del anticoagulante citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇) (Aquisel, Barcelona, España). Inmediatamente después de la extracción, los tubos se centrifugaron a 1500 x g durante 15 min para separar el plasma de las células sanguíneas. Las muestras de plasma resultantes se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

2.2. Ensayos anticoagulantes

La actividad anticoagulante de los extractos parasitarios L3AsS y L3AsES sobre la cascada de la coagulación del hospedador se evaluó mediante tres ensayos: el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y el tiempo de trombina (TT). La metodología empleada para estudiar dicha actividad fue la descrita por Gan *et al.* (311) con algunas modificaciones.

Mediante el PT y el APTT se analizó la capacidad de coagulación de la sangre en presencia o ausencia de los extractos parasitarios evaluando los factores de las vías extrínseca (FVII) e intrínseca (FXII, FXI, FIX, FVIII), respectivamente, además de los factores de la vía común (FX, FV, protrombina y fibrinógeno) (ambos ensayos) de la cascada de la coagulación. Por su parte, la capacidad de coagulación de la sangre a través de la conversión del fibrinógeno en fibrina se analizó mediante el TT. Estos ensayos se llevaron a cabo en microplacas multipocillo (Corning), donde se incubaron 0,5 µg por pocillo del extracto L3AsS o L3AsES en presencia de 50 µL de plasma de cerdo durante 2 min a 37 °C (ensayo PT), 50 µL de plasma de cerdo y 50 µL de reactivo de trabajo para APTT (BioSystems, Barcelona, España) durante 3 min a 37 °C (ensayo APTT) o 100 µL de plasma de cerdo durante 2 min a 37 °C (ensayo TT). El inicio de la reacción de coagulación se llevó a cabo añadiendo al mismo tiempo en todos los pocillos 100 µL de reactivo de trabajo para PT (BioSystems) (ensayo PT), 50 µL de una solución 0,025 M de cloruro de calcio (CaCl₂) (BioSystems) (ensayo APTT) o 100 µL de reactivo de trabajo para TT (BioSystems) (ensayo TT). Las reacciones de coagulación se monitorizaron midiendo la absorbancia mediante espectrofotometría (Microplate Absorbance Reader iMark, Bio-Rad, Hercules, EEUU) a 655 nm cada 6 s durante 42 s. Tanto el plasma de cerdo como los reactivos específicos para cada ensayo se calentaron a 37 °C inmediatamente antes de su uso. Como control negativo se substituyó el extracto parasitario (L3AsS o L3AsES) por un volumen igual de PBS. Cada muestra se analizó por triplicado.

2.3. Ensayo de inhibición del FXa

La capacidad de los extractos parasitarios L3AsS y L3AsES para inhibir el FXa se evaluó mediante un ensayo cromogénico, siguiendo la técnica descrita por Gan *et al.* (311) con escasas modificaciones. En microplacas multipocillo se incubaron 0,1 µg del

extracto L3AsS o L3AsES con FXa humano (Thermo Fisher Scientific) a una concentración final de 4 nM en tampón HEPES-BSA (50 mM ácido 4-[2-hidroxietil]-1-piperazina-etanosulfónico [HEPES] [C₈H₁₈N₂O₄S], pH 7,5; 100 mM NaCl; 5 mM CaCl₂; 1 mg/mL seroalbúmina bovina [BSA]), en un volumen final de 100 µL por pocillo durante 15 min a 37 °C. Una vez transcurrido ese tiempo, se añadió el sustrato cromogénico S-2765 (Chromogenix, Bedford, EEUU) a la solución anterior a una concentración final de 800 µM y se incubó durante 3 h a 37 °C. La hidrólisis del sustrato por parte del FXa se monitorizó midiendo la absorbancia mediante espectrofotometría a 415 nm cada 30 min. Como control negativo se sustituyó el extracto parasitario (L3AsS o L3AsES) por un volumen igual de PBS. Cada muestra se analizó por triplicado.

2.4. Ensayos de unión al plasminógeno

La determinación de la capacidad para unir plasminógeno de los extractos parasitarios L3AsS y L3AsES se llevó a cabo empleando técnicas de ELISA, *Western blot* e inmunofluorescencia.

2.4.1. Ensayo de unión al plasminógeno por ELISA

La metodología empleada para llevar a cabo el ensayo de unión a plasminógeno por ELISA fue la descrita por González-Miguel *et al.* (310) con escasas modificaciones. Se tapizaron microplacas multipocillo con 1 µg por pocillo del extracto L3AsS o L3AsES diluido en 200 µL de tampón carbonato (15 mM carbonato de sodio [Na₂CO₃]; 35 mM bicarbonato de sodio [NaHCO₃]; pH 9,6) y se incubaron durante 16 h a 4 °C para facilitar la adsorción de las proteínas a la placa. Posteriormente, las placas se postapizaron con 200 µL por pocillo de tampón de bloqueo, que contenía BSA diluido en PBS al 1 % (m/v), y se incubaron durante 30 min a 37 °C para evitar la aparición de uniones inespecíficas. A continuación, se añadieron cantidades crecientes (de 0 a 2 µg por pocillo) de plasminógeno humano (Acris Antibodies, Herford, Alemania) diluido en 100 µL de tampón de bloqueo y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después, las placas se incubaron sucesivamente con una IgG anti-plasminógeno humano desarrollada en oveja (Acris Antibodies) a una dilución de 1:2000 y una IgG anti-oveja conjugada con peroxidasa de rábano desarrollada en burro (Sigma-Aldrich) a una dilución de 1:4000. Ambas incubaciones se llevaron a cabo en 100 µL por pocillo de tampón de bloqueo durante 1 h a 37 °C. Entre cada paso, las placas se lavaron 3 veces con 200 µl por pocillo de tampón

T-PBS, que contenía Tween₂₀ (C₃₈H₁₁₄O₂₆) diluido en PBS al 0,05 % (v/v). El primer lavado fue de 3 min y los otros dos de 1 min. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló incubando 100 µL por pocillo de tampón sustrato (28 mM ácido cítrico [C₆H₈O₇]; 46 mM fosfato de hidrógeno disódico [Na₂HPO₄+12H₂O]; pH 5; 1,5 mM diclorhidrato de o-fenilendiamina [OPD] [C₆H₈N₂ 2HCl]; 0,04 % peróxido de hidrógeno [H₂O₂]) a temperatura ambiente y en oscuridad, y se detuvo añadiendo 100 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 3N. La absorbancia se midió mediante espectrofotometría a 492 nm. En paralelo se llevó a cabo un ensayo de competición incluyendo una solución 25 mM de ácido ε-aminocaproico (ε-ACA) (C₆H₁₃NO₂), un análogo de la lisina, durante la incubación con el plasminógeno. Como control negativo se sustituyó el extracto parasitario (L3AsS o L3AsES) por una cantidad igual de BSA. Cada muestra se analizó por triplicado.

2.4.2. Ensayo de unión al plasminógeno por *Western blot*

Para corroborar la unión del plasminógeno y caracterizar las bandas de proteínas de los extractos parasitarios L3AsS y L3AsES responsables del proceso de fijación, se empleó la técnica de *Western blot* siguiendo el protocolo descrito por Ramajo-Hernández *et al.* (312) con algunas modificaciones.

2.4.2.1. Electroforesis SDS-PAGE

En primer lugar, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE para separar las proteínas de los extractos L3AsS y L3AsES por peso molecular, para lo cual se empleó el equipo Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad). Se prepararon geles de poliacrilamida que constaban de un gel separador al 12 % (40 % acrilamida [C₃H₅NO] al 30 % [m/v]/bisacrilamida [C₇H₁₀N₂O₂] al 0,8 % [m/v]; 25 % 1,5 M tris[hidroximetil]aminometano [Tris] [C₄H₁₁NO₃], pH 8,8; 1 % persulfato de amonio [APS] [(NH₄)₂S₂O₈] al 10 % [m/v]; 0,04 % tetrametiletilendiamina [TEMED] [C₆H₁₆N₂]) de 1 mm de grosor sobre el que se situaba un gel de carga (17 % acrilamida al 30 % [m/v]/bisacrilamida al 0,8 % [m/v]; 12,5 % 1 M Tris, pH 6,8; 1 % APS al 10 % [m/v]; 0,1 % TEMED). Las muestras para cargar en dichos geles se prepararon añadiendo tampón de carga 4X (25 % 2 M Tris, pH 6,8; 40 % glicerol [C₃H₈O₃]; 0,28 M sodio dodecilsulfato [SDS] [NaC₁₂H₂₅SO₄]; 4 % 2-mercaptoetanol [C₂H₆OS]; trazas de azul de bromofenol [C₁₉H₁₀Br₄O₅S]) a 15 µg del extracto L3AsS o L3AsES e inmediatamente después se calentaron al baño maría durante 3 min para favorecer la desnaturalización de las proteínas. Las muestras resultantes se cargaron en los pocillos formados en el gel de

carga previamente preparado. En algunas muestras se sustituyó el extracto parasitario por 2 µg de plasminógeno humano como control positivo. Como control negativo se omitió la presencia del extracto parasitario en algunos pocillos. En el primer pocillo se cargó un marcador de pesos moleculares (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad). Finalmente, se introdujeron los geles en cubetas verticales de electroforesis y se cubrieron con tampón de electroforesis 1X (25 mM Tris; 192 mM glicina [C₂H₅NO₂]; 3,5 mM SDS) a 4 °C. Dichas cubetas se conectaron a una fuente de alimentación (PowerPac Universal, Bio-Rad) y se mantuvieron a 100 V hasta que el frente de electroforesis entró en contacto con el gel de separación y después a 180 V hasta que el frente de electroforesis alcanzó el extremo final del gel y se dio por concluido el proceso.

2.4.2.2. Transferencia y *Western blot*

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas por peso molecular se transfirieron desde algunos de los geles de poliacrilamida hasta membranas de nitrocelulosa empleando la técnica de electrotransferencia semiseca. Para ello, se recortaron membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de grosor (Bio-Rad) y un tamaño similar al de los geles, las cuales se humedecieron en tampón de transferencia 1X (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20 % metanol [CH₃OH]; pH 8,3) a 4 °C junto con los geles de poliacrilamida y dos papeles gruesos de fibra de algodón (Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad) por membrana. A continuación, se preparó un sándwich formado por los siguientes elementos en sentido descendente (desde el cátodo hacia el ánodo del equipo de electrotransferencia): papel grueso, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa y papel grueso. Dichos sándwiches se colocaron en el interior del equipo de electrotransferencia semiseca (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) y este se conectó a una fuente de alimentación aplicando un voltaje constante de 20 V durante 30 min.

Tras finalizar la transferencia, se separaron las membranas de nitrocelulosa del resto de componentes del sándwich y se lavaron rápidamente con tampón T-PBS. El bloqueo o postapizado de cada membrana se llevó a cabo con 10 mL de tampón de bloqueo, que contenía BSA diluido en tampón T-PBS al 2 % (m/v), durante 1 h a temperatura ambiente para evitar la aparición de uniones inespecíficas. Después, se incubaron con 10 µg/mL de plasminógeno humano diluido en tampón de bloqueo durante 16 h a 4 °C. Posteriormente, las membranas se incubaron sucesivamente con una IgG anti-

plasminógeno humano desarrollada en oveja a una dilución de 1:1000 y con una IgG anti-oveja conjugada con peroxidasa de rábano desarrollada en burro a una dilución de 1:2000. Ambas incubaciones se llevaron a cabo en tampón de bloqueo durante 1 h 30 min a 37 °C. Entre cada paso se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con tampón T-PBS. Las reacciones antígeno-anticuerpo se revelaron con una solución de tampón sustrato con peroxidasa (2,8 mM 4-cloronaftol [C₁₀H₇ClO]; 20 % metanol; 80 % PBS; 0,04 % H₂O₂ al 33 % [m/v]) y se detuvieron añadiendo agua ultrapura.

2.4.2.3. Tinción

Otra parte de los geles obtenidos por electroforesis se tiñeron para detectar las bandas de proteínas de los extractos parasitarios separadas por peso molecular. Para ello, se empleó una tinción de nitrato de plata siguiendo un protocolo compatible con espectrometría de masas. Los geles se incubaron sucesivamente en una solución de fijación (40 % etanol; 10 % ácido acético [CH₃COOH]) y una solución de sensibilización (30 % etanol; 4 % tiosulfato de sodio [Na₂S₂O₃] al 5 % [m/v]; 0,8 M acetato de sodio) durante 30 min a temperatura ambiente. Tras la segunda incubación, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con agua ultrapura. A continuación, los geles se incubaron en una solución 10 % de nitrato de plata (AgNO₃) al 2,5 % (m/v) durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Tras realizar dos lavados de 1 min cada uno con agua ultrapura, las proteínas se revelaron añadiendo una solución de revelado (0,2 M carbonato de sodio; 0,04 % formaldehído al 37 % masa-masa [m/m]), proceso que se detuvo tras sustituir dicha solución por otra 0,05 M de EDTA durante 5 min. Finalmente, se realizó un lavado de 5 min con agua ultrapura y los geles se almacenaron a 4 °C en una solución de ácido acético al 1 % (v/v).

2.4.2.4. Obtención y análisis de imágenes

Tanto los geles obtenidos por SDS-PAGE y teñidos con nitrato de plata como las membranas resultantes del *Western blot* se digitalizaron empleando el escáner GS-800 Densitometer (Bio-Rad) y se analizaron con el *software* Quantity One v.4.6.5 (Bio-Rad). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.4.3. Ensayo de unión al plasminógeno por inmunofluorescencia

Con el objetivo de localizar la unión del plasminógeno en la superficie de las L3As, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia que fue analizado por microscopía

confocal siguiendo el protocolo descrito por Ramajo-Hernández *et al.* (312) con escasas modificaciones. Las L3As intactas, previamente fijadas en formaldehído al 10 % (v/v), se lavaron con PBS y se incubaron con 10 µg/mL de plasminógeno humano en una solución que contenía BSA diluido en PBS al 1 % (m/v) durante 2 h a temperatura ambiente en agitación suave. A continuación, se incubaron con 10 µg/mL de un anticuerpo anti-plasminógeno humano unido a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Acris Antibodies) diluido en PBS durante 16 h a 4 °C en oscuridad y agitación suave. Entre cada paso, se realizaron cuatro lavados con PBS centrifugando a 16 000 x g durante 5 min. Las muestras resultantes se analizaron con el objetivo de inmersión en agua 63x del microscopio confocal TCS SP2 DM IRB (Leica) utilizando un láser de Argón 488 nm y un filtro de 500 nm en el servicio de microscopía del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) (España). En paralelo se llevó a cabo un ensayo de competición incluyendo 40 mM de ε-ACA durante la incubación con el plasminógeno. Como control negativo se omitió la presencia del plasminógeno en algunos ensayos. Cada muestra se analizó por triplicado.

2.5. Ensayo de activación del plasminógeno

La capacidad de los extractos parasitarios L3AsS y L3AsES para activar el plasminógeno y potenciar la generación de plasmina se evaluó mediante un ensayo cromogénico siguiendo las metodologías empleadas por González-Miguel *et al.* (310) y Fernandes *et al.* (313) con escasas modificaciones. El ensayo se llevó a cabo en microplacas multipocillo, en un volumen final de 100 µL, midiendo la actividad amidolítica de la plasmina generada sobre un sustrato cromogénico. En cada pocillo se incubó 1 µg de plasminógeno humano en PBS con 3 µg del sustrato cromogénico S-2251 (Sigma-Aldrich), en presencia de 1 µg del extracto L3AsS o L3AsES. La activación del plasminógeno se inició añadiendo 15 ng de tPA (Sigma-Aldrich) o 10 ng de uPA (Sigma-Aldrich) y las microplacas se incubaron durante 2 h 30 min a 37 °C. La hidrólisis del sustrato se monitorizó midiendo la absorbancia por espectrofotometría a 415 nm. Para estudiar la capacidad de los extractos parasitarios para generar plasmina por sí mismos, se omitió la presencia de los activadores del plasminógeno tPA y uPA en algunos pocillos. Como control negativo se sustituyó el extracto parasitario (L3AsS o L3AsES) por una cantidad igual de BSA. Cada muestra se analizó por triplicado.

2.6. Caracterización e identificación de las proteínas responsables de la inhibición del FXa y de la unión del plasminógeno

Las proteínas de los extractos parasitarios L3AsS y L3AsES con capacidad potencial para inhibir el FXa o unir el plasminógeno fueron caracterizadas mediante distintas técnicas electroforéticas, identificadas por espectrometría de masas y analizadas por medio de diversas herramientas bioinformáticas.

2.6.1. Electroforesis SDS-PAGE para la caracterización de las proteínas con potencial para inhibir el FXa

Para determinar si proteínas de los extractos parasitarios L3AsS y L3AsES eran capaces de formar un complejo de inhibición estable con el FXa, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE siguiendo la técnica descrita por Fonseca *et al.* (314) con algunas modificaciones. Para desarrollar dicha electroforesis, se empleó un procedimiento similar al descrito en el apartado 2.4.2.1 de la sección «Materiales y Métodos» de la presente Tesis Doctoral. En primer lugar, se prepararon los geles de poliacrilamida y las muestras a cargar en dichos geles. En este caso, los geles constaban de un gel de separación al 10 % (33 % acrilamida al 30 % [m/v]/bisacrilamida al 0,8 % [m/v]; 25 % Tris 1,5 M pH 8,8; 1 % APS al 10 % [m/v]; 0,04 % TEMED) y las muestras se prepararon incubando 10 µg del extracto L3AsS o L3AsES, 1 µg del FXa o una mezcla de ambos componentes (10 µg del extracto parasitario correspondiente + 1 µg del FXa) en una solución 5 mM de tampón HEPES, pH 7,4, durante 45 min a temperatura ambiente antes de añadir el tampón de carga. Posteriormente, se montó la cubeta, se cargaron las muestras en los geles y se programó la electroforesis. Una vez finalizada, los geles se tiñeron empleando una tinción de nitrato de plata compatible con espectrometría de masas, descrita en el apartado 2.4.2.3 de la presente sección, y las imágenes de los mismos se obtuvieron y analizaron del mismo modo que en el apartado 2.4.2.4 de esta misma sección. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.6.2. Electroforesis bidimensional y *Western blot* para la caracterización de las proteínas con potencial para unir plasminógeno

Para la caracterización de las proteínas de unión a plasminógeno presentes en los extractos parasitarios L3AsS y L3AsES, se utilizaron técnicas de electroforesis bidimensional (2D) y *Western blot* siguiendo la metodología previamente descrita por González-Miguel *et al.* (310).

2.6.2.1. Rehidratación de las tiras IPG

En primer lugar, ambos extractos (L3AsS y L3AsES) fueron purificados utilizando el kit ReadyPrep 2-D Cleanup (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante, con el objetivo de eliminar todos aquellos compuestos que pudieran interferir en el transcurso de la electroforesis. Los sedimentos resultantes se resuspendieron en tampón de rehidratación (7 M urea [CH₄N₂O]; 2 M tiourea [CH₄N₂S]; 0,07 M 3-[[3-colamidopropil] dimetilamonio]-1-propanosulfonato [CHAPS] [C₃₂H₅₈N₂O₇S]; trazas de azul de bromofenol) (60 µg de proteína en 125 µL de tampón por muestra) para favorecer la desnaturalización de las proteínas. Posteriormente, las muestras se solubilizaron en presencia de 50 mM ditioneitol (DTT) (C₄H₁₀O₂S₂) y anfolitos 3-10 (Bio-Rad) al 1 % (v/v) durante 15 min a temperatura ambiente en agitación suave para prevenir la oxidación de las proteínas y generar un gradiente de pH, respectivamente. Después, las muestras se clarificaron por centrifugación a 16 000 x g durante 15 min a 4 °C y se aplicaron a tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (Bio-Rad) de 7 cm de longitud de un intervalo de pH de 3-10. Para ello, las tiras IPG se colocaron sobre las muestras previamente depositadas en una bandeja de rehidratación, permitiendo el contacto entre el gel de la tira IPG y la muestra, y se cubrieron con 2 mL de aceite mineral para impedir la precipitación de la urea y la evaporación de las muestras. A continuación, la bandeja de rehidratación se introdujo en el aparato de isoelectroenfoque (IEF) (Protean IEF Cell, Bio-Rad) para llevar a cabo una rehidratación pasiva de las muestras durante 16 h a 20 °C.

2.6.2.2. Separación de las proteínas en una primera dimensión

Al finalizar el proceso, las proteínas quedaron absorbidas por el gel de las tiras IPG, por lo que se procedió a la separación de las mismas en una primera dimensión por

punto isoeléctrico mediante IEF. Las tiras IPG se transfirieron a una bandeja de IEF, colocando debajo de ellas unos papeles absorbentes (*wicks*) humedecidos en agua ultrapura en los dos puntos en los que la tira IPG contactaba con el electrodo, para evitar su contacto directo y retener aquellos compuestos que pudieran afectar al resultado de la electroforesis. Después, las tiras IPG se cubrieron con 2 mL de aceite mineral para evitar posibles evaporaciones de la muestra. Una vez preparada la bandeja, esta se introdujo en el aparato de IEF y se mantuvo a una temperatura constante de 20 °C y un amperaje máximo de 50 μ A por tira IPG durante la duración del IEF. Este proceso constó de cuatro etapas en las que se aplicaron diferentes voltajes: 1) 250 V durante 15 min; 2) 4000 V durante 2 h; 3) 4000 V a 16 000 V/hora; 4) fase de mantenimiento a 500 V hasta la detención del IEF.

2.6.2.3. Equilibrado de las tiras IPG

Tras finalizar la primera dimensión de la electroforesis, se procedió a realizar el equilibrado de las tiras IPG, con las proteínas ya separadas por punto isoeléctrico. Este proceso constó de una primera incubación de dichas tiras en una solución 0,13 M de DTT diluido en tampón de equilibrado (6 M urea; 2 % SDS; 0,05 M Tris 1,5 M/HCl, pH 8,8; 30 % glicerol; trazas de azul de bromofenol) durante 15 min a temperatura ambiente en agitación suave para conservar el estado reducido de las proteínas. A continuación, se realizó una segunda incubación de las tiras IPG en una solución 0,14 M de iodoacetamida (C_2H_4INO) diluida en tampón de equilibrado durante 10 min a temperatura ambiente en agitación suave para alquilar las proteínas y prevenir su posible reoxidación.

2.6.2.4. Separación de las proteínas en una segunda dimensión

Para separar las proteínas en una segunda dimensión por su peso molecular, se llevó a cabo un procedimiento similar al descrito en el apartado 2.4.2.1 de la sección «Materiales y Métodos» de la presente Tesis Doctoral. Se prepararon geles de separación al 12 % (40 % acrilamida al 30 % [m/v]/bisacrilamida al 0,8 % [m/v]; 25 % 1,5 M Tris, pH 8,8; 1 % SDS al 10%; 1 % APS al 10 % [m/v]; 0,04 % TEMED) de 1 mm de grosor sobre los que se colocaron las tiras IPG. A la izquierda de ellas se incorporó un *wick* humedecido en una solución 50 % patrón de pesos moleculares (Bio-Rad)/50 % agarosa ($C_{12}H_{18}O_9$) diluida en tampón de electroforesis al 0,5 % (m/v). Después, tanto el *wick* como la tira IPG se cubrieron con agarosa diluida en tampón de electroforesis al 0,5 % (m/v) para evitar la formación de burbujas entre las tiras IPG y los geles que pudieran

afectar al desarrollo de la electroforesis. A continuación, se montó la cubeta y se programó la electroforesis, en este caso a 15 mA por tira IPG hasta que el frente entró en el gel de electroforesis y después a 30 mA por tira IPG hasta que el frente alcanzó el extremo final del gel.

2.6.2.5. Tinción y *Western blot*

Una vez finalizado el proceso, una parte de los geles conteniendo las proteínas de los extractos L3AsS o L3AsES separadas en dos dimensiones (punto isoeléctrico y peso molecular) se tiñeron empleando una tinción con nitrato de plata compatible con espectrometría de masas, descrita en el apartado 2.4.2.3 de la sección «Materiales y Métodos». El resto de los geles se destinaron a realizar un *Western blot* para poder visualizar en ellos aquellos puntos (*spots*) que contenían proteínas de unión a plasminógeno, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.4.2.2 de esta misma sección. En este caso, como control negativo se omitió la incubación con el plasminógeno en algunas membranas. Las imágenes tanto de los geles como de las membranas se obtuvieron y analizaron del mismo modo que en el apartado 2.4.2.4 de la presente sección. Los *spots* de unión a plasminógeno revelados en las membranas de nitrocelulosa se parearon con sus homólogos en los geles 2D utilizando el *software* PDQuest v.8.0.1 (Bio-Rad). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.6.3. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Las bandas que potencialmente pudieran contener los complejos de inhibición formados entre proteínas del extracto parasitario (L3AsS o L3AsES) y el FXa y aquellos *spots* seleccionados en L3AsS y L3AsES que revelaron la unión del plasminógeno se escindieron manualmente de los geles previamente obtenidos por electroforesis y teñidos con nitrato de plata. Estas muestras se enviaron al servicio de proteómica del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia (España) para ser analizadas por espectrometría de masas.

Para identificar los complejos de inhibición entre el extracto parasitario y el FXa, se empleó cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Las muestras se prepararon mediante digestión con 50 ng de tripsina de grado de secuenciación (Promega, Madison, EEUU) (315). La mezcla resultante se secó en una centrífuga de vacío y después se resuspendió en 7 μ L de acetonitrilo (ACN) (C_2H_3N) al

2 % (v/v) y ácido trifluoroacético (TFA) ($C_2HF_3O_2$) al 0,1 % (v/v). Para realizar el análisis LC-MS/MS, se cargaron 5 μ L de cada muestra en una columna *trap* (NanoLC Trap, ChromXP, C18-CL 3 μ m, 120 Å, 350 μ m x 0,5 mm) (Eksigent Technologies, Framingham, EEUU) y se desalaron con TFA al 0,1 % (v/v) a 3 μ L/min durante 5 min. A continuación, los péptidos se cargaron en una columna analítica (NanoLC Column, 3 C18-CL-120, 3 μ m, 120 Å, 75 μ m x 15 cm) (Eksigent Technologies) equilibrada en ACN al 5 % (v/v) y ácido fórmico (FA) (CH_2O_2) al 0,1 % (v/v). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de B en A al 30 % (v/v) (A: FA al 0,1 % [v/v]; B: ACN, FA al 0,1 % [v/v]) durante 20 min a un caudal de 300 nL/min. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nano-ESI-QqTOF (5600 TripleTOF) (AB Sciex, Framingham, EEUU) y cada muestra se ionizó en un Source Type Optiflow <1 μ L Nano aplicando 3,0 kV al emisor de pulverización a 200 °C. Los análisis se llevaron a cabo en un modo dependiente de datos. Los escaneos *survey* MS1 se adquirieron de 350 a 1400 *m/z* durante 250 ms. La resolución del cuadrupolo se estableció en «baja» para los experimentos MS2, que se adquirieron de 100 a 1500 *m/z* durante 25 ms en modo «alta sensibilidad». Se utilizaron los siguientes criterios de cambio: carga 2+ a 4+, intensidad mínima y 250 cuentas por segundo. Se seleccionaron hasta 100 iones para la fragmentación después de cada escaneo de inspección. La exclusión dinámica se fijó en 15 s. La sensibilidad del sistema se controló analizando 0,5 μ g de tripsina de digestión K562 (SCIEX, Framingham, EEUU). Se utilizaron los parámetros predeterminados de ProteinPilot (SCIEX) para generar una lista de picos directamente desde los archivos 5600 TripleTOF. Se empleó el algoritmo Paragon (316) de ProteinPilot v 5.0 para buscar en las bases de datos Swiss-Prot y UniProt_Nematoda con los siguientes parámetros: especificidad de tripsina, cis-alquilación, taxonomía no restringida y esfuerzo de búsqueda configurado con análisis FDR. La agrupación de proteínas fue realizada por el algoritmo del grupo Pro.

En el caso del análisis de los *spots* de unión a plasminógeno de L3AsS y L3AsES, se empleó una técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF/TOF). La preparación de las muestras se llevó a cabo de la misma forma que para el análisis LC-MS/MS previamente descrito, colocando 1 μ L de cada una de ellas en la placa objetivo. Las gotas se secaron al aire a temperatura ambiente y a continuación se añadió 1 μ L de matriz (10 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico - ácido α -ciano-2,4-difluorocinámico - ácido α -ciano-2,3,4,5,6-

pentafluorocinámico [CHCA] [C₁₀H₇NO₃] [Sigma-Aldrich] en TFA-ACN al 0,1 %/H₂O [1:1, v/v]) y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Las mezclas resultantes se analizaron en un espectrómetro 5800 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (AB Sciex) en modo reflectrón positivo. Cinco de los precursores más intensos fueron seleccionados para cada posición para el análisis por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Los datos de MS/MS fueron adquiridos utilizando el método predeterminado MS/MS 1 kV con disociación inducida por colisión (CID) activa. La información de espectrometría de masas y MS/MS se envió al servidor MASCOT a través de ProteinPilot (AB Sciex). Las muestras que no tuvieron identificación significativa por MALDI-TOF/TOF se analizaron por LC-MS/MS siguiendo una metodología similar a la descrita anteriormente. La búsqueda se realizó en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) con especificidad triptica, permitiendo una escisión fallida y una tolerancia en la medición de masa de 100 ppm en modo MS y 0,8 Da para iones MS/MS. La carbamidometilación de Cys se usó como modificación fija y la oxidación de Met y desaminación de Asn y Gln, como modificaciones variables.

2.6.4. Análisis bioinformáticos

Las proteínas de interés para el estudio identificadas en los extractos L3AsS y L3AsES por espectrometría de masas se analizaron mediante diversas herramientas bioinformáticas.

En el caso de las secuencias de aminoácidos de las proteínas que potencialmente inhibían el FXa, se utilizaron las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Swiss-Prot/UniProt (<http://www.uniprot.org/>) para la búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de las secuencias homólogas, la base de datos Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) para el análisis de los dominios conservados de las proteínas, el servidor SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (317) para la predicción de los péptidos señal y el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para el alineamiento de secuencia múltiple. La fecha de acceso a todos los sitios web arriba citados fue el 4 de noviembre de 2020.

La función molecular de las proteínas identificadas como fijadoras de plasminógeno y el proceso biológico en el que participan se asignaron según las bases de datos Gene Ontology Resource (<http://www.geneontology.org>) y Swiss-Prot/UniProt. La predicción de las estructuras secundarias de las proteínas identificadas y el modelo

tridimensional (3D) de las secuencias resultantes se realizó con el servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) (318). Los modelos 3D se visualizaron con el *software* RasMol v.2.7.5.2. En este caso, la fecha de acceso a todos los sitios web fue el 11 de junio de 2019.

2.7. Análisis estadísticos

Los resultados de los ensayos anticoagulantes, del ensayo de inhibición del FXa, del ensayo de unión a plasminógeno por ELISA y del ensayo de activación del plasminógeno fueron analizados estadísticamente mediante el test de la *t* de Student. Los datos se expresaron como la media aritmética \pm la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se establecieron con un valor *p* menor de 0,05 para un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS

1. Revisión de alcance sobre la interacción molecular entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados

1.1. Consideraciones generales

Con el fin de realizar una revisión de alcance sobre la interacción molecular entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados, se llevó a cabo una búsqueda sistemática de literatura y la posterior selección de las fuentes de evidencia, proceso que se recoge en la [Figura 16](#). Tras obtener los resultados de la búsqueda en cada una de las bases de datos seleccionadas, se eliminaron los duplicados, generándose un total de 4818 registros. Estos fueron sometidos a un proceso de revisión siguiendo los criterios de elegibilidad descritos en el apartado 1.2 de la sección «Materiales y Métodos» de la presente Tesis Doctoral. La aplicación de los cuatro primeros criterios, realizada desde la propia base de datos, permitió seleccionar 198 registros con acceso al texto completo de la publicación. Durante la revisión en profundidad de dicho documento, se aplicaron los tres criterios restantes, generándose un total de 99 registros. Además, tres de ellos fueron eliminados al no aportar datos adicionales (con relación a la revisión de alcance) a trabajos incluidos en la revisión con una fecha de publicación previa, de manera que, finalmente, se seleccionaron 96 fuentes de evidencia cuyas referencias bibliográficas se encuentran recogidas en el [Anexo IV](#). A continuación, se revisaron las citadas publicaciones para extraer y analizar la información pertinente, la cual se encuentra tabulada en el [Anexo V](#). Dicha información hace referencia a la descrita en el apartado 1.4 de la sección «Materiales y Métodos» e incluye datos del artículo en cuestión, así como del parásito responsable de la interacción y de la propia interacción parásito-hospedador.

Todas las publicaciones seleccionadas describían métodos experimentales llevados a cabo para demostrar eventos asociativos específicos y propositivos (unión, activación, inhibición o degradación) entre helmintos parásitos y los componentes del sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados mencionados en el apartado 1.3 de la sección «Materiales y Métodos». Se recogieron un total de 259 interacciones, que se diferenciaron en al menos una de las siguientes características: especie de parásito, estadio del parásito, material parasitario y componente del sistema hemostático. El periodo de

estudio comprendió 64 años, desde 1956, fecha en la que se publicó el primer artículo identificado en la presente revisión de alcance, hasta 2019, último año considerado. Del total de años analizado, solamente en 35 se publicó al menos un artículo relacionado con el ámbito de la revisión. La tasa de publicación se incrementó progresivamente a lo largo del tiempo, desde los 32 trabajos publicados en el siglo XX (16 años incluidos), hasta los 64 artículos publicados en el siglo XXI (19 años incluidos) (Figura 17).

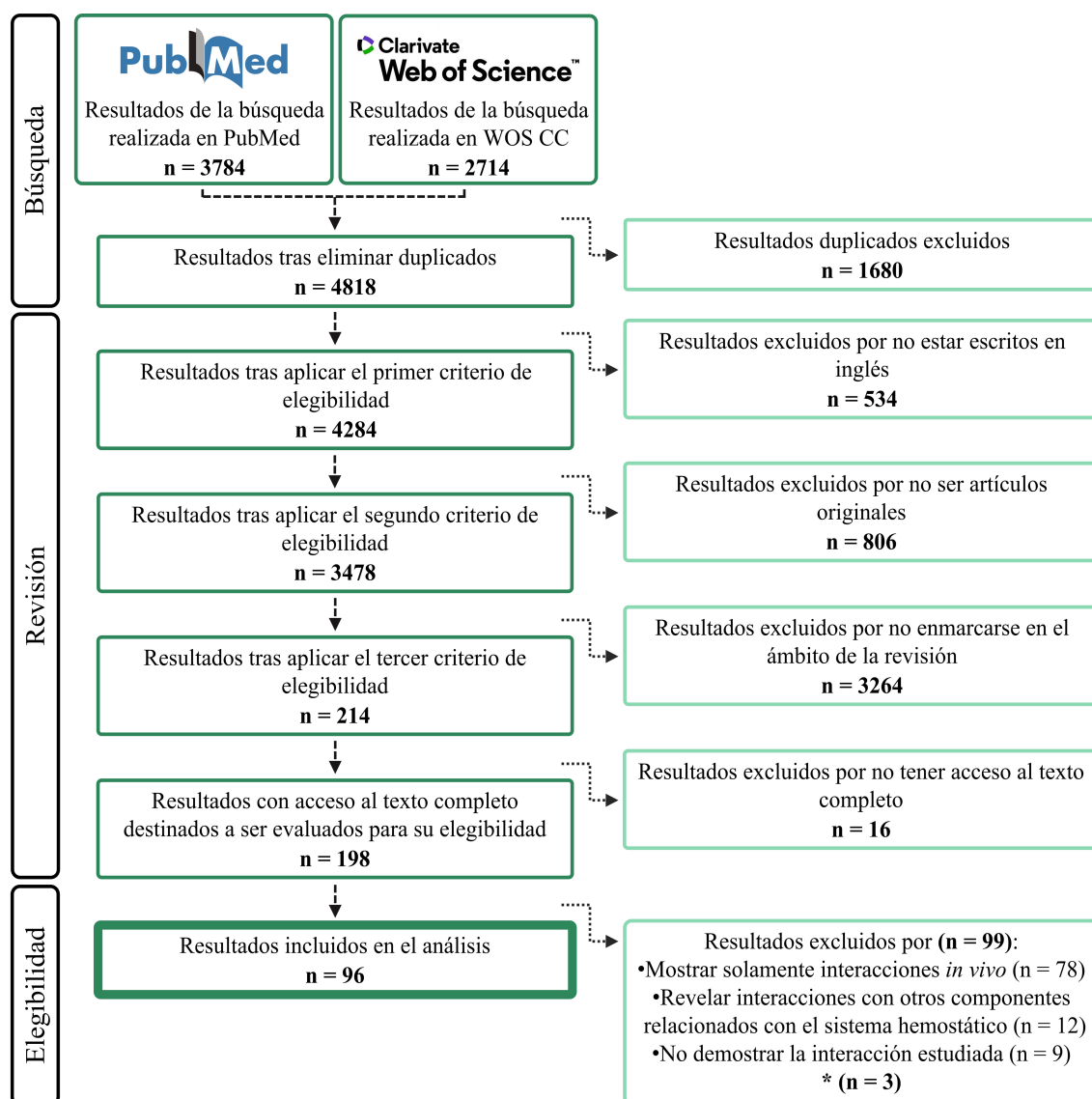


Figura 16. Diagrama de flujo del proceso de búsqueda y selección de la literatura para la revisión de alcance. En la parte izquierda se recoge el número de publicaciones identificadas en la búsqueda realizada en cada una de las bases de datos empleada y el número de resultados obtenidos tras eliminar los duplicados y aplicar los diferentes criterios de elegibilidad. En la parte derecha se muestra el número de resultados excluidos en las distintas fases del proceso de búsqueda, revisión y elegibilidad de las fuentes de evidencia. Los resultados marcados con un asterisco (*) corresponden a aquellos que fueron eliminados por ofrecer únicamente datos duplicados a los proporcionados por artículos previamente publicados e incluidos en la revisión de alcance. Abreviaturas: n, número de resultados.

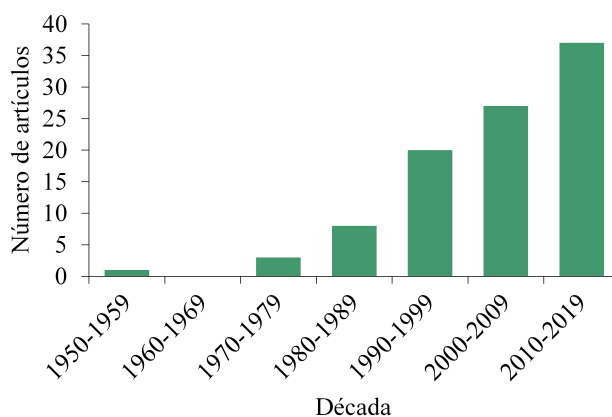


Figura 17. Número de fuentes de evidencia por década del periodo considerado en la revisión de alcance.

1.2. Características de la interacción parásito-hospedador

La mayor parte de las interacciones entre helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados identificadas en la presente revisión de alcance se describieron con componentes del sistema de la coagulación (179 interacciones, 69,11 %). De ellas, 76 interacciones (42,46 %) se produjeron con diferentes rutas de la cascada de la coagulación, 31 (17,32 %) con el fibrinógeno, 26 (14,53 %) con las plaquetas y 18 (10,06 %) con el FXa. Para el resto de componentes del sistema de la coagulación con los que se describió alguna interacción (vWF, TF-FVIIa, FXIIa, FXIa, FX, FXa-FVa, trombina y fibrina) se identificaron entre 1 y 7 interacciones (Figura 18). En la mayoría de los casos, el resultado de la interacción fue la inhibición del sistema de la coagulación (123 interacciones, 68,72 %), principalmente a través de la inhibición de las vías extrínseca, intrínseca o común de la cascada de la coagulación, del FXa o de la agregación de plaquetas. El resto de interacciones con este sistema se asociaron con su activación (10 interacciones, 5,59 %), la unión de plaquetas o de factores de la coagulación (13 interacciones, 7,26 %) y la degradación del fibrinógeno o de la fibrina (33 interacciones, 18,44 %) (Figura 18).

La interacción de helmintos parásitos con el sistema fibrinolítico de sus hospedadores se describió en 80 casos (30,89 %), siendo el plasminógeno la molécula de esta ruta para la que se registraron un mayor número de interacciones (67 interacciones, 83,75 %). Las proteínas restantes de este sistema con las que se produjo alguna interacción (tPA, uPA, PAI-1 y plasmina) se identificaron en 1 a 6 casos. De todas las interacciones identificadas con el sistema fibrinolítico, 38 (47,5 %) se relacionaron directamente con su activación y 3 (3,75 %) con su inhibición. La unión del plasminógeno

(34 interacciones, 42,5 %) y la degradación del plasminógeno (5 interacciones, 6,25 %) correspondieron al resto de interacciones producidas con este sistema (Figura 18).

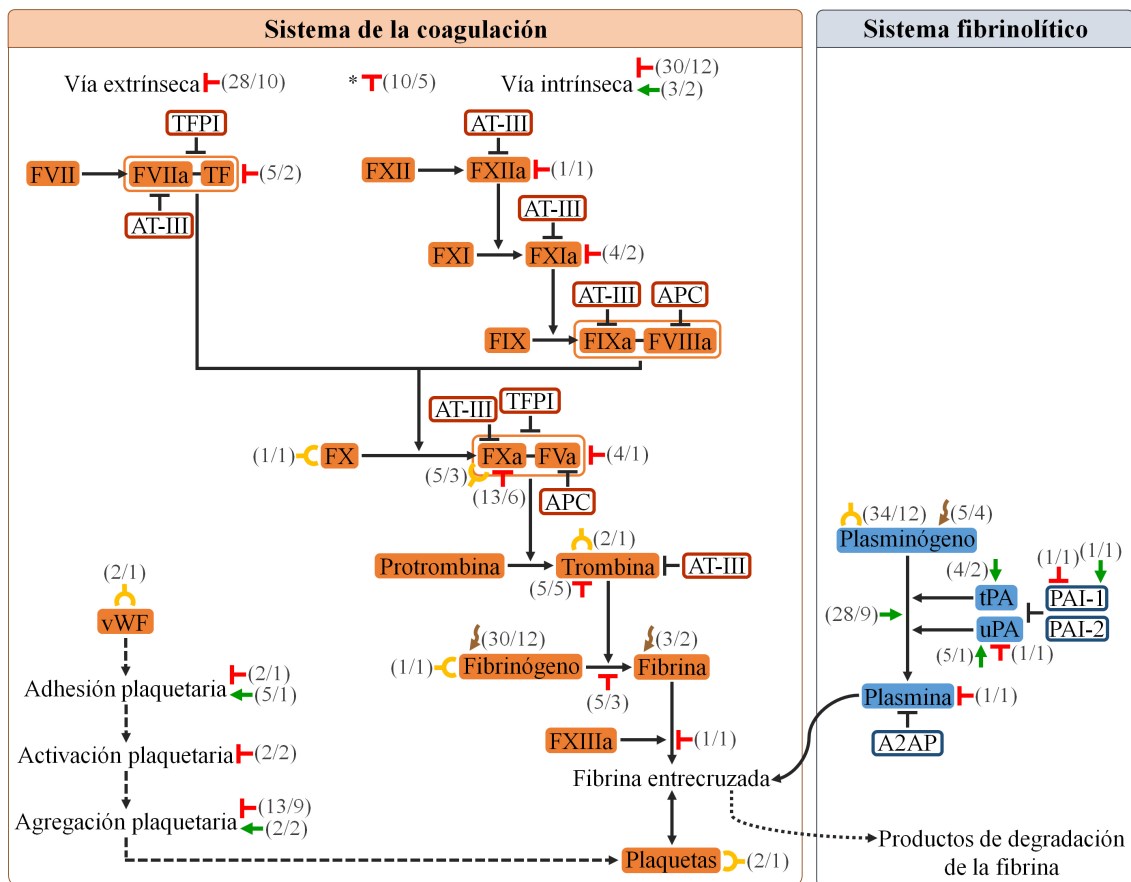


Figura 18. Diagrama de las interacciones identificadas en la revisión de alcance entre especies de helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados. Los componentes analizados en la presente revisión pertenecientes al sistema de la coagulación se muestran en naranja, mientras que los correspondientes al sistema fibrinolítico aparecen en azul. La flecha continua, el símbolo «T» y la flecha curvada entre dos componentes del sistema hemostático indican activación, inhibición y degradación, respectivamente, del segundo componente por la acción del primero, la flecha doble indica cohesión entre dos componentes y la flecha discontinua refleja las distintas fases de un proceso no incluidas en ninguna de las categorías anteriores. Dos componentes del sistema de la coagulación englobados en un rectángulo y unidos por un guion (–) constituyen un complejo. Los símbolos coloreados en verde (\rightarrow), rojo (\downarrow), amarillo (\curvearrowright) y marrón (\curvearrowleft) indican activación, inhibición, unión y degradación, respectivamente, del componente del sistema hemostático señalado por, al menos, una de las especies de helmintos parásitos identificadas en la revisión de alcance. Estos símbolos están acompañados de un paréntesis que contiene dos números separados por una barra: (número de interacciones del tipo de interacción señalada / número de especies de helmintos parásitos en las que se describió dicha interacción). El asterisco (*) representa aquellas interacciones que tuvieron como resultado la inhibición de la coagulación sin que se especificara la ruta afectada de dicho sistema. Abreviaturas: F, factor; a, activado; TF, factor tisular; TFPI, inhibidor de la ruta del factor tisular; AT-III, antitrombina III; APC, proteína C activada; vWF, factor de von Willebrand; tPA, activador tisular del plasminógeno; uPA, activador del plasminógeno de tipo uroquinasa; PAI, inhibidor de los activadores del plasminógeno; A2AP, α 2-antiplasmina.

1.2.1. Efecto sobre la formación o disolución de coágulos sanguíneos y proceso biológico atribuidos a la interacción

Con arreglo a la información contenida en las fuentes de evidencia seleccionadas, el efecto potencial de la interacción entre el helminto parásito y el sistema hemostático sobre la formación o disolución de coágulos sanguíneos en el hospedador se describió en 189 interacciones. De ellas, en 141 (74,6 %) se clasificó como «anticoagulante», en 39 (20,63 %) como «profibrinolítico» y en 9 (4,76 %) como «procoagulante» (Figura 19A). Las interacciones con componentes específicos del sistema de la coagulación se asociaron, principalmente, con un efecto anticoagulante (92,62 %), mientras que a aquellas interacciones descritas entre helmintos parásitos y el sistema fibrinolítico del hospedador se les atribuyó, de manera predominante, un potencial profibrinolítico (92,5 %).

El proceso biológico en el que estas interacciones parásito-hospedador podrían estar implicadas se indicó en 184 de las 259 interacciones identificadas y se clasificó del siguiente modo: nutrición parasitaria (69 interacciones, 37,5 %), supervivencia del parásito (52 interacciones, 28,26 %), patogénesis en el hospedador (35 interacciones, 19,02 %), invasión parasitaria de los tejidos del hospedador (32 interacciones, 17,39 %), evasión parasitaria de los sistemas de defensa del hospedador (28 interacciones, 15,22 %), migración parasitaria a través de los tejidos del hospedador (26 interacciones, 14,13 %), establecimiento del parásito en el hospedador (13 interacciones, 7,07 %), acciones ejercidas por el parásito para compensar sus propios efectos en el hospedador (9 interacciones, 4,89 %) y modulación parasitaria de los mecanismos del hospedador (2 interacciones, 1,09 %) (Figura 19B). De ellos, «nutrición parasitaria» (48,28 %) fue el proceso atribuido de forma mayoritaria a las interacciones identificadas con el sistema de la coagulación, mientras que las interacciones con el sistema fibrinolítico se asociaron, principalmente, con mecanismos de supervivencia parasitaria (48,53 %) y de patogénesis en el hospedador (44,12 %).

Al relacionar el efecto potencial de la interacción sobre la formación o disolución de coágulos sanguíneos en el hospedador y el proceso biológico en el que podría estar implicada se observó que un efecto anticoagulante se asociaba, mayoritariamente, con procesos de nutrición parasitaria (50,54 %), mientras que un potencial profibrinolítico se relacionaba, principalmente, con mecanismos de supervivencia parasitaria (63,64 %) y la aparición de procesos patológicos en el hospedador (45,45 %).

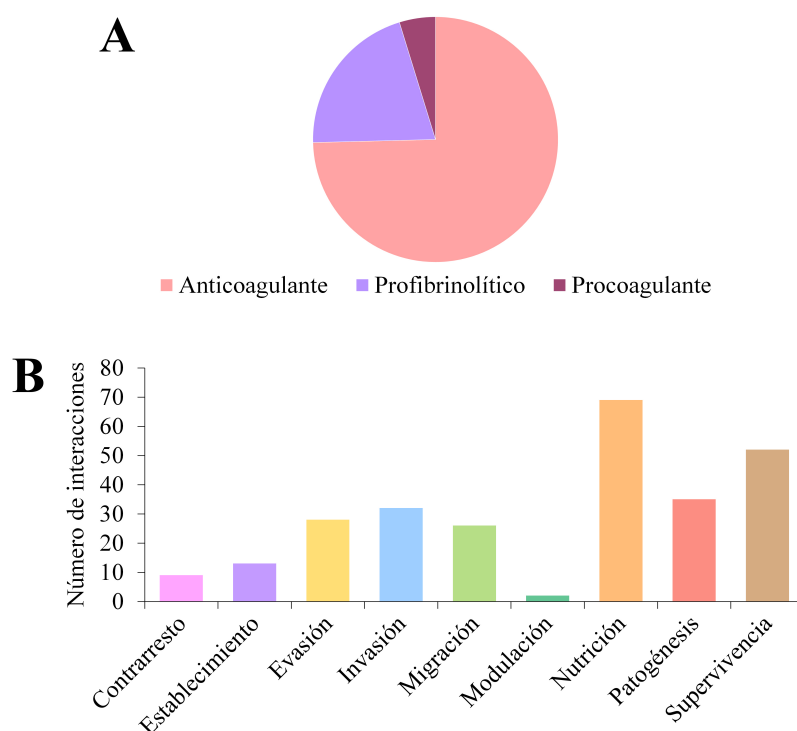


Figura 19. Efecto sobre la formación o disolución de coágulos sanguíneos en el hospedador y proceso biológico atribuidos a la interacción parásito-hospedador. (A) Porcentaje de interacciones por efecto atribuido a la interacción helminto parásito-sistema hemostático en relación a la formación o disolución de coágulos sanguíneos en el hospedador. (B) Número de interacciones por proceso biológico en el que la interacción helminto parásito-sistema hemostático estaría implicada.

De las 96 publicaciones analizadas en la revisión de alcance, únicamente 2 (2,08 %) mostraron experimentos llevados a cabo con el objetivo de validar la funcionalidad de los procesos biológicos que se le habían atribuido a la interacción parásito-hospedador. En particular, estos estudios revelaron que la activación del sistema fibrinolítico del hospedador por parte del parásito *Dirofilaria immitis* producía la estimulación de la proliferación y migración celulares y la degradación de matriz extracelular (ver los artículos 76 y 78 en el Anexo V).

1.3. Información biológica y molecular de los parásitos

1.3.1. Especie de parásito

Conforme a la información ofrecida por las fuentes de evidencia incluidas en la revisión de alcance, se hallaron interacciones con el sistema hemostático en 32 especies de helmintos parásitos pertenecientes a 22 géneros (18 nematodos, 8 trematodos y 6 cestodos). La especie que mostró el mayor número de interacciones fue *Ancylostoma caninum* (56 interacciones, 21,62 %), seguida de *Schistosoma mansoni* (38 interacciones,

14,67 %) y *D. immitis* (27 interacciones, 10,42 %). En las 29 especies restantes, se describieron entre 1 y 15 interacciones (Figura 20).

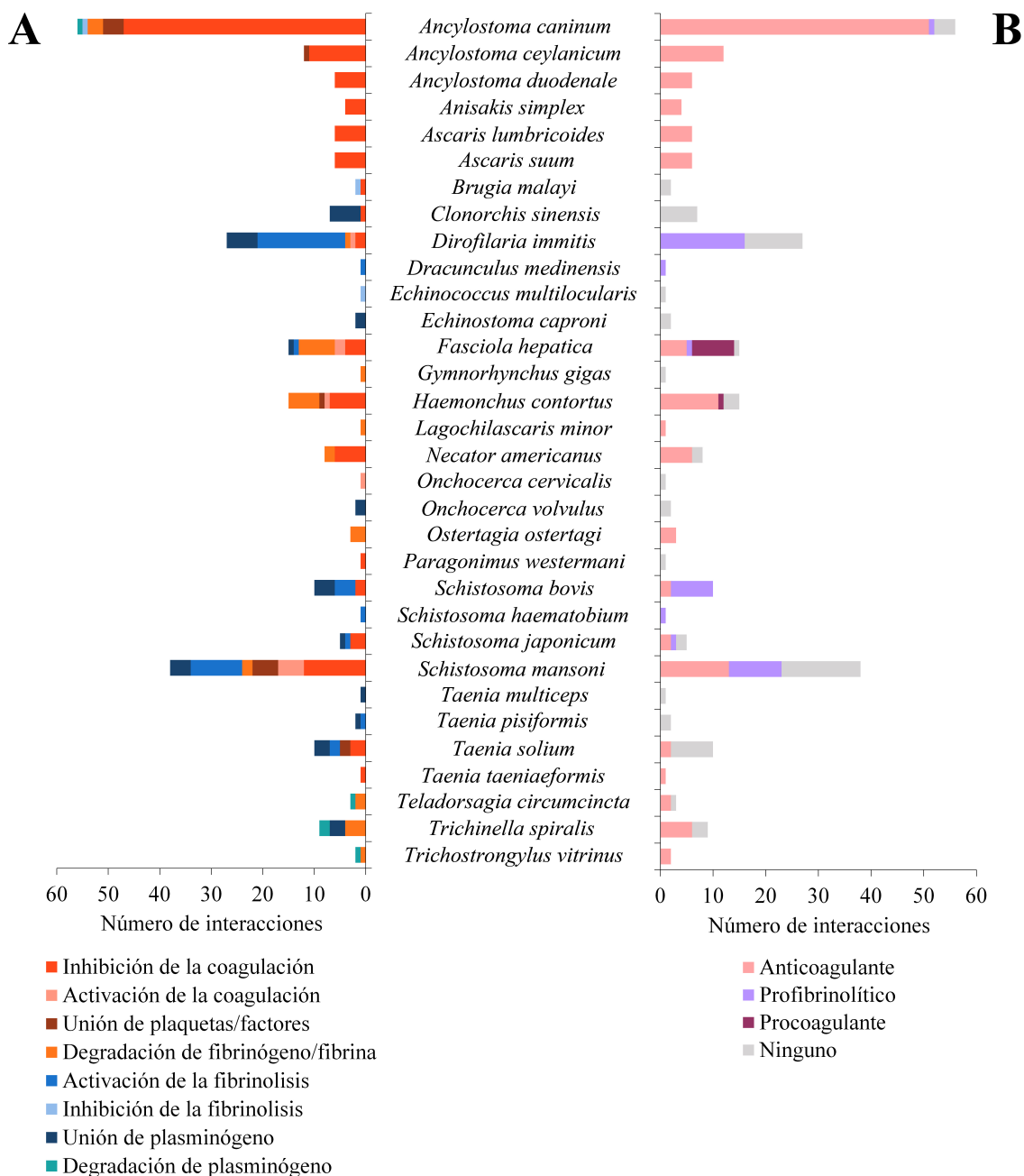


Figura 20. Tipo de interacción con el sistema hemostático y efecto sobre la formación o disolución de coágulos sanguíneos en el hospedador atribuido a la interacción por especie de helminto parásito. (A) Número de interacciones por especie de helminto parásito y tipo de interacción con el sistema hemostático del hospedador. (B) Número de interacciones por especie de helminto parásito y efecto atribuido a la interacción con el sistema hemostático sobre la formación o disolución de coágulos sanguíneos en el hospedador.

Del número total de especies identificadas, 25 (78,13 %) revelaron interacciones con el sistema de la coagulación y 19 (59,38 %) con el sistema fibrinolítico. En algunas

de ellas, como *A. caninum*, *A. ceylanicum*, *Haemonchus contortus*, *Fasciola hepatica* y *Necator americanus*, predominaron las interacciones producidas con el sistema de la coagulación, mientras que, en otras como *Clonorchis sinensis*, *D. immitis* y *S. bovis*, se identificaron, principalmente, interacciones con el sistema fibrinolítico. En otras especies (p. ej. *S. mansoni*, *Taenia solium* y *Trichinella spiralis*) se describió un número similar de interacciones con las dos vías del sistema hemostático. En general, las interacciones predominantes en las que participaron estas especies fueron la inhibición del sistema de la coagulación, la activación del sistema fibrinolítico, la degradación del fibrinógeno o de la fibrina y la unión del plasminógeno, de factores de la coagulación o de las plaquetas (Figura 20A). Las interacciones específicas entre cada una de las especies identificadas y el sistema hemostático se recogen en el Anexo VI. En todas las especies, estas interacciones se asociaron, principalmente, con un efecto anticoagulante y/o profibrinolítico, excepto en *F. hepatica*, que fueron relacionadas, de forma mayoritaria, con un potencial procoagulante (Figura 20B).

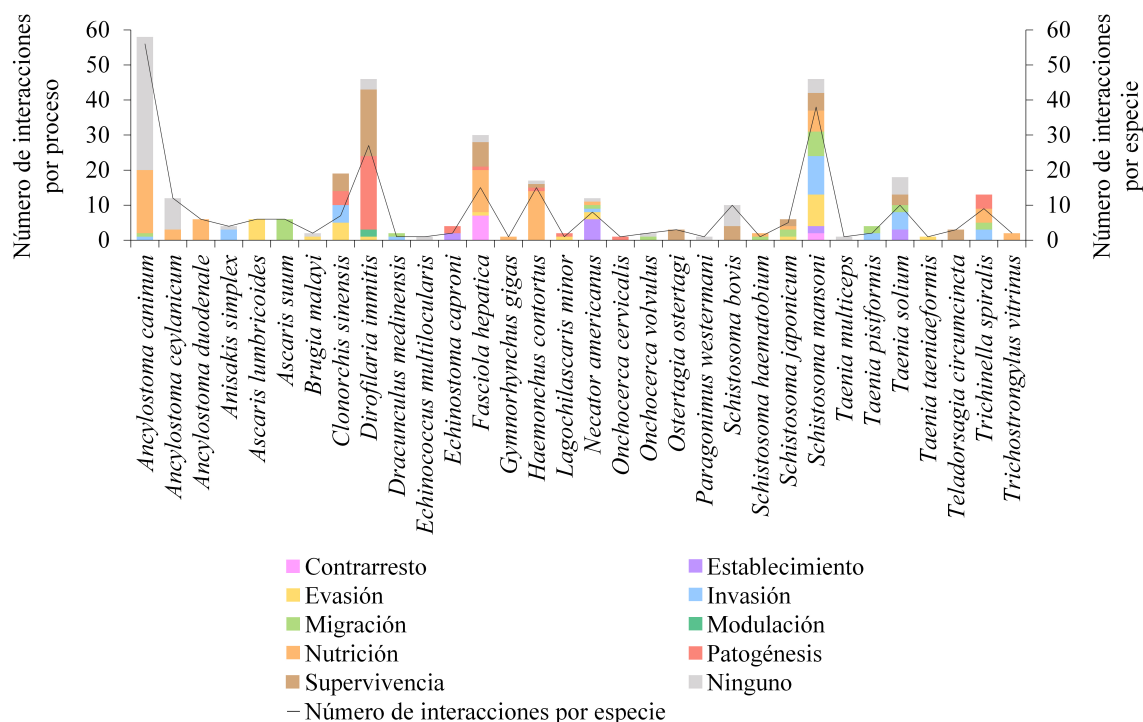


Figura 21. Proceso biológico atribuido a la interacción parásito-hospedador por especie de helminto parásito. Número de interacciones por especie de helminto parásito y proceso biológico atribuido a la interacción con el sistema hemostático del hospedador (eje izquierdo y barras de colores) y número total de interacciones identificadas por especie de helminto parásito (eje derecho y línea negra).

Las interacciones entre algunas especies, como *Ancylostoma* spp., *F. hepatica* y *H. contortus*, y el sistema hemostático del hospedador se relacionaron, principalmente,

con procesos de nutrición parasitaria. En el caso de *D. immitis*, los procesos biológicos atribuidos con mayor frecuencia a dicha interacción fueron «supervivencia parasitaria» y «patogénesis en el hospedador». Con respecto a las interacciones entre *S. mansoni* y el sistema hemostático, estas se relacionaron con todos los procesos biológicos recogidos en la revisión, a excepción de mecanismos patogénicos en el hospedador y de modulación parasitaria (Figura 21).

1.3.2. Estadio del parásito y material parasitario

De las 259 interacciones identificadas, en 223 se proporcionaron datos sobre el estadio del parásito que se empleó para estudiar la interacción con el sistema hemostático del hospedador. De ellas, el 76,68 % (171 interacciones) se hallaron en vermes adultos, el 20,18 % (45 interacciones) en estadios larvarios y el 3,14 % (7 interacciones) en huevos (Figura 22A). Los procesos biológicos mayoritariamente atribuidos a las interacciones descritas en vermes adultos fueron «nutrición parasitaria» (45,3 %), «supervivencia parasitaria» (37,61 %) y «patogénesis en el hospedador» (27,35 %), mientras que las interacciones identificadas en estadios larvarios se relacionaron, principalmente, con mecanismos parasitarios de invasión (41,67 %), evasión (30,56 %) y migración (19,44 %).

Los dos materiales parasitarios más frecuentemente empleados para evaluar las interacciones con el sistema hemostático del hospedador fueron proteínas recombinantes (117 interacciones, 45,17 %) y extractos complejos (106 interacciones, 40,93 %). En el resto de los casos se utilizaron parásitos completos (18 interacciones, 6,95 %), proteínas nativas (10 interacciones, 3,86 %) y fracciones proteicas (8 interacciones, 3,09 %) (Figura 22B). Respecto al compartimento al que se adscribió el material parasitario responsable de la interacción, se recogieron datos en 130 casos. De ellos, el 47,69 % (62 interacciones) se identificaron en el extracto somático del parásito, el 40,77 % (53 interacciones) en sus productos excretores/secretores y el 11,54 % (15 interacciones) en las moléculas asociadas a su superficie (Figura 22C).

Considerando únicamente los dos materiales parasitarios más utilizados, se observó que los extractos complejos se utilizaron durante todo el periodo analizado (1956-2019), mientras que las proteínas recombinantes se emplearon por primera vez en 1996. En el siglo XX, el 64,21 % y el 15,79 % de las interacciones se estudiaron empleando extractos complejos y proteínas recombinantes, respectivamente. Por el

contrario, en el siglo XXI, el porcentaje de interacciones descritas utilizando extractos complejos descendió hasta el 27,44 %, mientras que el uso de proteínas recombinantes se incrementó hasta el 62,2 %.

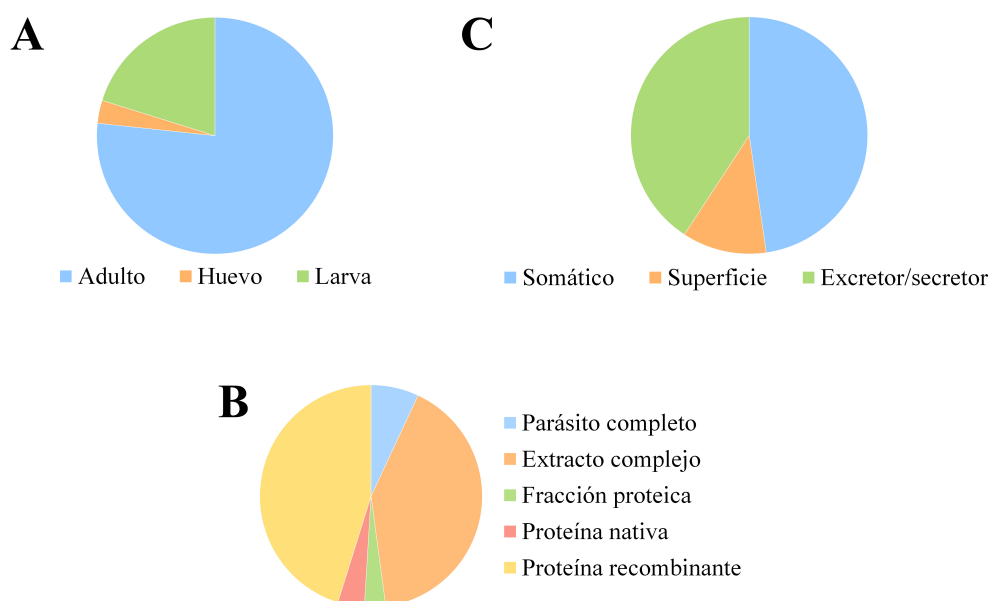


Figura 22. Estadio del parásito, material parasitario y compartimento del material parasitario en el que se describe la interacción parásito-hospedador. Porcentaje de interacciones por (A) estadio del helminto parásito, (B) material parasitario y (C) compartimento del material parasitario empleado para estudiar la interacción con el sistema hemostático del hospedador.

1.3.3. Moléculas parasitarias

De las 259 interacciones identificadas en el estudio, 154 aportaron datos sobre la molécula parasitaria responsable de la interacción (empleada para llevar a cabo los experimentos o identificada tras descubrirse la interacción), información que se recoge en el Anexo VII. En todas ellas, excepto en dos interacciones llevadas a cabo por carbohidratos, una proteína resultó ser la molécula responsable de la interacción (152 interacciones, 98,7 %). Se identificaron un total de 53 proteínas parasitarias implicadas en la interacción con el sistema hemostático del hospedador. Una vez tipificadas, el grupo que reveló un mayor número de interacciones fue aquel que incluyó diferentes péptidos o proteínas anticoagulantes de *Ancylostoma* spp. (49 interacciones, 32,24 %), seguido de las enolasas (20 interacciones, 13,16 %), las serina-proteasas (12 interacciones, 7,89 %), las anexinas (11 interacciones, 7,24 %), las catepsinas y las metaloproteasas (10 interacciones por grupo, 6,58 %), las cisteína-proteasas y las gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas (GAPDH) (9 interacciones por grupo, 5,92 %), las actinas (8 interacciones, 5,26 %), las aspartato-proteasas y las fructosa-bisfosfato aldolasas (7

interacciones por grupo, 4,61 %), las serpinas (6 interacciones, 3,95 %) y las galectinas y las proteínas de tipo Kunitz (5 interacciones por grupo, 3,29 %). Las 39 proteínas restantes participaron en 1 a 3 interacciones (Anexo VII). Las enolasas fueron las proteínas identificadas como moléculas de interacción en un mayor número de especies de helmintos parásitos (12 especies, 37,5 %), seguidas de las serina-proteasas (7 especies, 21,88 %) y las serpinas (6 especies, 18,75 %). Las aspartato-proteasas, cisteína-proteasas, metaloproteasas y GAPDH se identificaron en 5 especies (15,63 %). El número de especies en las que se describieron las 46 proteínas restantes como moléculas de interacción oscilaron entre 1 y 3 (Anexo VII).

Considerando solamente aquellas proteínas identificadas en un mayor número de interacciones, los datos mostraron que algunas de ellas revelaban interacciones únicamente con componentes del sistema de la coagulación (aspartato-proteasas, cisteína-proteasas y proteínas de tipo Kunitz) o del sistema fibrinolítico (actinas, enolasas, fructosa-bisfosfato aldolasas, galectinas y GAPDH), mientras que para otras (anexinas, péptidos o proteínas anticoagulantes de *Ancylostoma* spp., catepsinas, metaloproteasas, serina-proteasas y serpinas) se describieron interacciones con las dos vías del sistema hemostático, aunque en estos casos aquellas producidas con el sistema de la coagulación fueron predominantes. La mayoría de estas proteínas se relacionaron únicamente con un efecto anticoagulante (péptidos o proteínas anticoagulantes de *Ancylostoma* spp., aspartato-proteasas, serpinas, proteínas de tipo Kunitz) o profibrinolítico (actinas, enolasas, fructosa-bisfosfato aldolasas, galectinas, GAPDH), o ambos en el caso de las anexinas (66,67 % anticoagulante/33,33 % profibrinolítico). Otras proteínas se asociaron con un potencial anticoagulante y/o profibrinolítico junto con un efecto procoagulante, como fue el caso de las catepsinas (62,5 % anticoagulante/12,5 % profibrinolítico/25 % procoagulante), las cisteína-proteasas (57,14 % anticoagulante/42,86 % procoagulante), las metaloproteasas (70 % anticoagulante/30 % procoagulante) y las serina-proteasas (33,33 % anticoagulante/33,33 % profibrinolítico/33,33 % procoagulante).

1.4. Técnicas

Según los datos obtenidos en la revisión de alcance, las técnicas empleadas con mayor frecuencia para estudiar la interacción entre helmintos parásitos y el sistema de la coagulación de sus hospedadores vertebrados fueron los ensayos del tiempo de coagulación (76 interacciones, 42,46 %), la electroforesis SDS-PAGE (22 interacciones,

12,29 %) y los ensayos cromogénicos (15 interacciones, 8,38 %). Los tiempos de coagulación medidos en un mayor número de casos fueron el APTT (34 interacciones, 18,99 %), el PT (28 interacciones, 15,64 %) y el TT (5 interacciones, 2,79 %), que se emplearon para estudiar las vías intrínseca (APTT), extrínseca (PT) y común (APTT y PT) de la cascada de la coagulación y la conversión del fibrinógeno en fibrina (TT). Mediante la electroforesis SDS-PAGE y los ensayos cromogénicos se evaluaron la unión o degradación de factores de la coagulación y su inhibición, respectivamente. En el caso del sistema fibrinolítico, las interacciones de helmintos parásitos con esta ruta se estudiaron, principalmente, mediante técnicas de inmunoblot (33 interacciones, 41,25 %), ensayos cromogénicos (24 interacciones, 30 %) y ELISA (22 interacciones, 27,5 %). Las técnicas de inmunoblot y de ELISA se emplearon para evaluar la unión del plasminógeno y la expresión de activadores e inhibidores del plasminógeno, mientras que los ensayos cromogénicos se utilizaron para estudiar la activación del plasminógeno. En 71 de las 179 interacciones identificadas con el sistema de la coagulación (39,66 %) y en 13 de las 80 interacciones descritas con el sistema fibrinolítico (16,25 %), se emplearon 33 y 6 técnicas diferentes a las citadas anteriormente, respectivamente.

De las 132 interacciones identificadas en parásitos completos, extractos complejos o fracciones proteicas, 27 (20,45 %) mostraron datos sobre la caracterización o identificación de la/s molécula/s responsable/s de la interacción. Las técnicas más empleadas para caracterizar o identificar estas moléculas fueron la electroforesis SDS-PAGE (10 interacciones, 37,04 %) y la espectrometría de masas (5 interacciones, 18,52 %).

2. Estudio de la interacción entre la larva de tercer estadio de *Ascaris suum* y el sistema hemostático de su hospedador

Con el objetivo de estudiar experimentalmente la interacción molecular entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados, se empleó como modelo la larva de tercer estadio de *A. suum* (L3As). Así, una vez obtenido el material parasitario, se analizó la interacción entre los compartimentos de superficie (L3AsS) y excretor/secretor (L3AsES) de las L3As y las dos rutas principales que conforman el sistema hemostático: el sistema de la coagulación y el sistema fibrinolítico.

2.1. Obtención del material parasitario

Tras extraer los huevos de hembras adultas de *A. suum*, estos se incubaron en unas condiciones favorables para el desarrollo de las L3. Las distintas fases del proceso de incubación se pueden observar en la Figura 23. Una vez formadas las larvas, se indujo la eclosión de los huevos (Figura 24A) y, aquellas que habían sido liberadas, se separaron del resto del material parasitario mediante el método de Baermann (Figura 24B y Figura 24C). Posteriormente, se obtuvieron los extractos complejos L3AsS y L3AsES de las L3As. En primer lugar, mediante el empleo de un kit que permitió obtener una recta patrón, se halló la concentración proteica de ambos extractos, que fue de 0,745 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para L3AsS y de 0,979 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para L3AsES (Figura 25A). A continuación, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE, la cual mostró bandas proteicas comprendidas entre 15 y 100 kDa para ambos extractos parasitarios (Figura 25B).

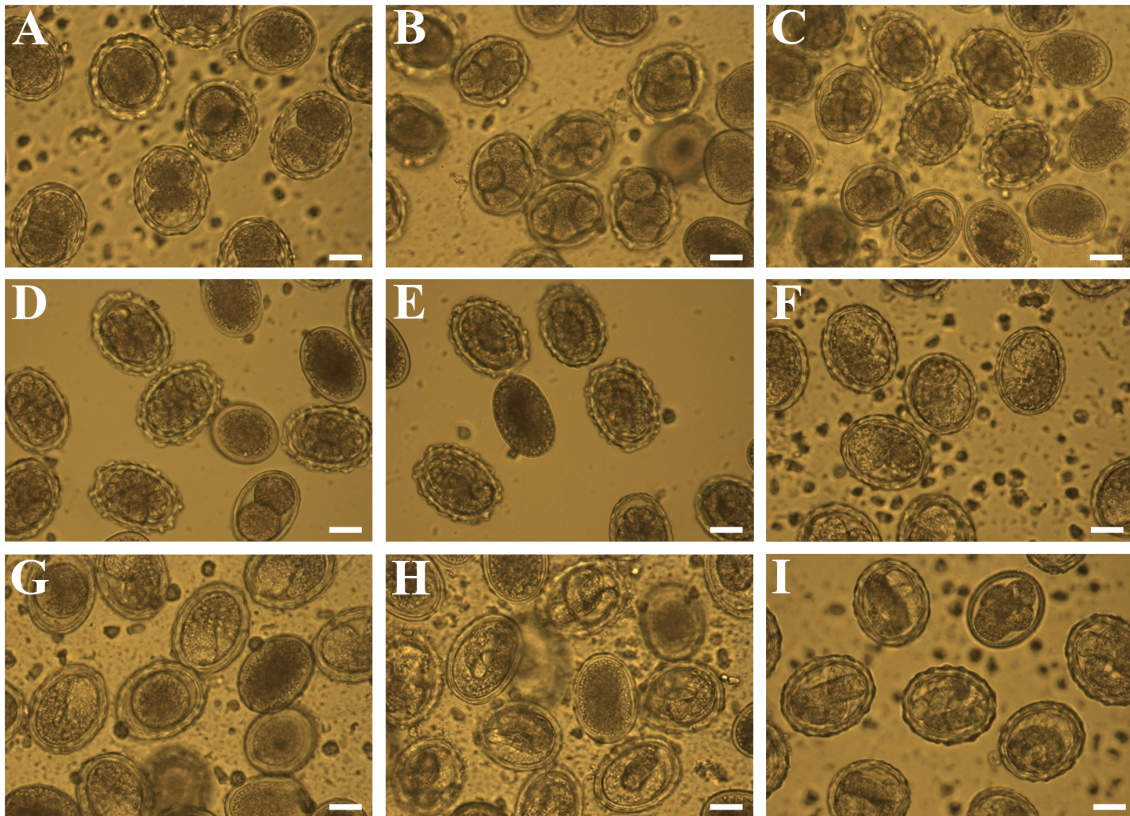


Figura 23. Desarrollo embrionario de *A. suum*. Fases del proceso de incubación de huevos de *A. suum* ordenadas cronológicamente. (A) Estadio de 2 células: 2 días de incubación. (B) Estadio de 4 células: 4 días de incubación. (C) Estadio de 8 células: 5 días de incubación. (D) Estadio de 16 células: 6 días de incubación. (E-H) Evolución en el proceso de formación de la larva: 7, 8, 11 y 12 días de incubación, respectivamente. (I) Imagen definitiva de la larva a simple vista, ya que no cambió su forma durante el resto del proceso de incubación: 13 días de incubación, aproximadamente. Barras de escala: 25 μm .

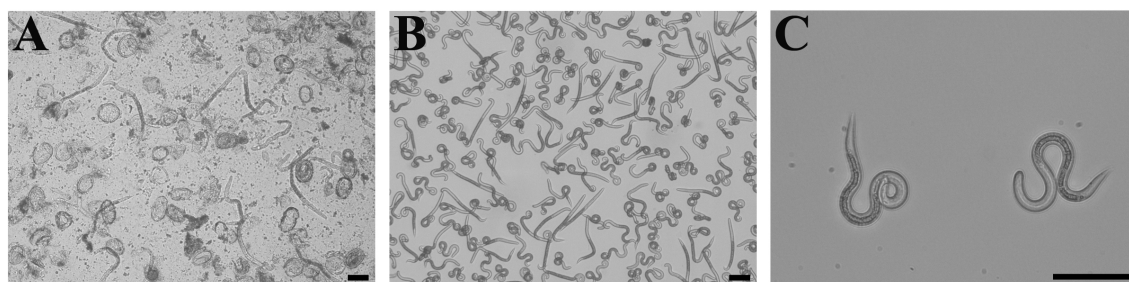


Figura 24. Larvas de tercer estadio de *A. suum*. (A) Larvas recién liberadas durante el proceso de eclosión. También se observan algunas larvas que todavía permanecen en el interior del huevo y cáscaras de los que ya han eclosionado. (B y C) Larvas separadas del resto del material parasitario tras aplicar la técnica de Baermann. Barras de escala: 85 μ m.

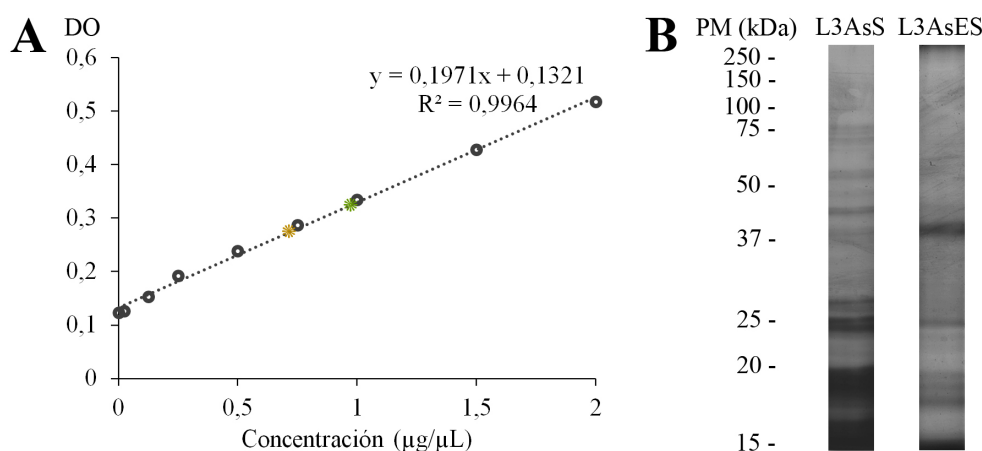


Figura 25. Valoración cuantitativa y cualitativa de los extractos complejos de las L3As. (A) Concentración proteica de L3AsS (*) y L3AsES (*) en la recta patrón obtenida tras medir la densidad óptica de viales de BCA de concentración conocida. (B) Patrón de bandas de L3AsS y L3AsES en electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12 %. Abreviaturas: DO, densidad óptica; PM: peso molecular.

2.2. L3AsS y L3AsES poseen actividad anticoagulante

La actividad anticoagulante de los extractos L3AsS y L3AsES se evaluó mediante ensayos para el análisis de los tiempos de coagulación PT, APTT y TT. Dichos ensayos permiten valorar, en muestras de plasma, el tiempo que tarda en formarse un coágulo sanguíneo, al analizar la eficacia de los factores que participan en las vías extrínseca (PT), intrínseca (APTT) y común (PT y APTT) de la cascada de la coagulación, así como la capacidad de conversión del fibrinógeno en fibrina (TT). Estos experimentos permiten correlacionar positivamente la densidad óptica de las muestras con la estabilidad del coágulo sanguíneo. Así, los resultados de los ensayos PT y APTT revelaron que ambos extractos parasitarios tienen capacidad anticoagulante. Esto se debe a que los valores de densidades ópticas que se obtuvieron al incubar plasma de cerdo en presencia de L3AsS o L3AsES fueron significativamente inferiores a lo largo del tiempo a los de sus controles

negativos, en los que se sustituyó cada extracto parasitario por un volumen igual de PBS ($p < 0,05$) (Figura 26). Al comparar los resultados obtenidos en estos ensayos para ambos extractos se observó que L3AsS presenta mayor actividad anticoagulante, pues las diferencias significativas halladas entre el extracto y su control negativo fueron superiores para L3AsS que para L3AsES. En el ensayo TT no se hallaron diferencias significativas entre ninguno de los extractos parasitarios y su control negativo ($p < 0,05$) (Figura 26).

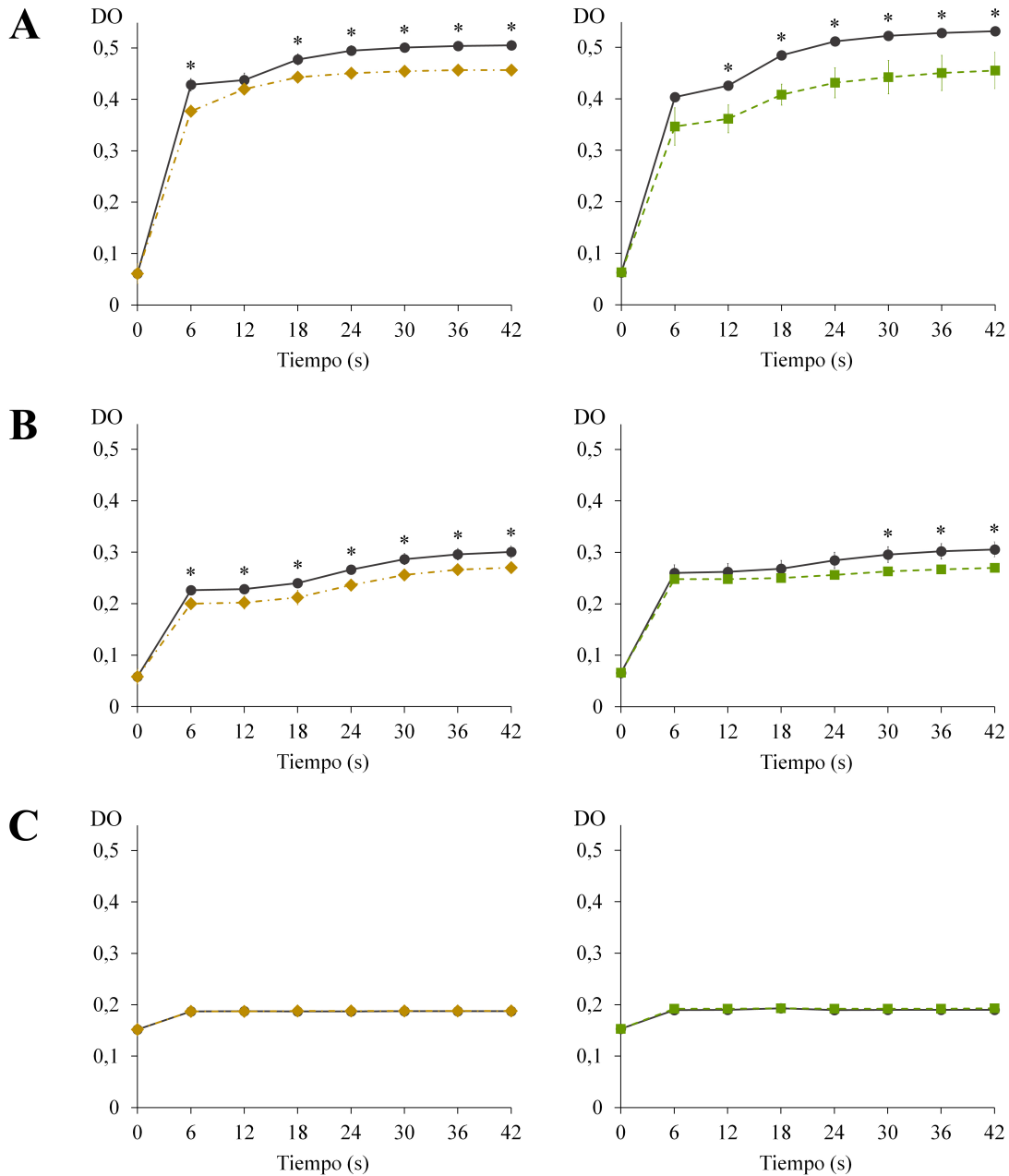


Figura 26. Actividad anticoagulante de L3AsS (◆) y L3AsES (■) evaluada mediante los ensayos PT (A), APTT (B) y TT (C). Incubación de plasma de cerdo con 0,5 µg del extracto parasitario (L3AsS o L3AsES) o PBS como control negativo (●) y el reactivo correspondiente (PT, APTT o TT). Cada punto representa la media de tres réplicas ± SD. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) están señaladas con un asterisco (*). Abreviaturas: DO, densidad óptica.

2.3. L3AsS y L3AsES inhiben el FXa

El FXa es uno de los principales factores de la cascada de la coagulación al representar el punto de convergencia de las vías extrínseca e intrínseca y, por tanto, el inicio de la vía común que conduce a la formación de la fibrina que estabiliza el coágulo sanguíneo. La actividad inhibitoria de los extractos L3AsS y L3AsES sobre este factor se estudió en un ensayo cromogénico que permitió valorar la actividad enzimática del FXa en presencia y ausencia de cada extracto parasitario mediante el empleo de un cromógeno específico. En dicho ensayo, el color emitido por cada muestra, medido por la absorbancia y representado por la densidad óptica, es directamente proporcional al nivel de actividad de la enzima. Los resultados mostraron que ambos extractos parasitarios son capaces de inhibir el FXa, al obtenerse valores de densidades ópticas significativamente más bajos para las muestras que contenían estos extractos que para sus controles negativos con volúmenes iguales de PBS a lo largo del tiempo ($p < 0,05$). Pese a que las diferencias significativas entre el extracto y su control negativo se manifestaron antes en el caso de L3AsES, estas fueron superiores para L3AsS (Figura 27).

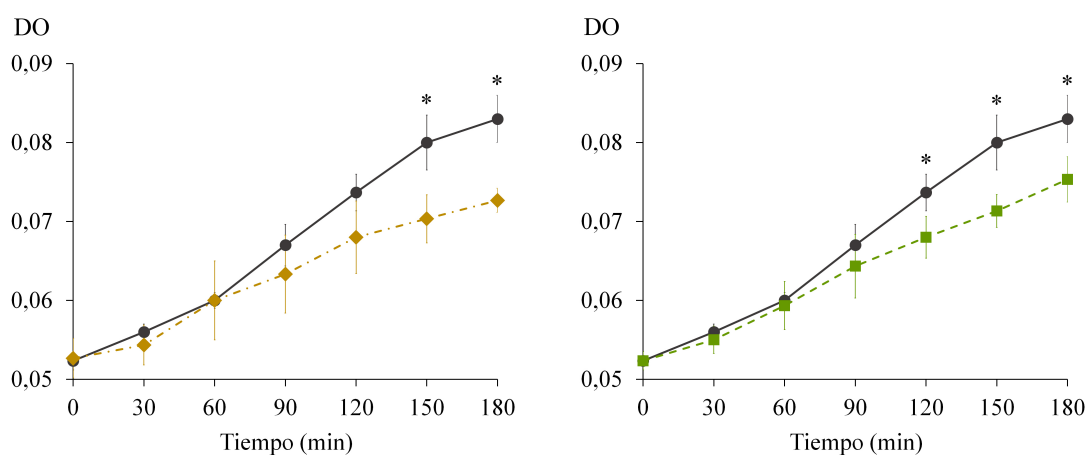


Figura 27. Inhibición del FXa por L3AsS (◆) y L3AsES (■). Incubación de 0,1 μ g del extracto parasitario (L3AsS o L3AsES) o PBS como control negativo (●) con 4 nM del FXa y 800 μ M de S-2765 en un volumen total de 100 μ L. Cada punto representa la media de tres réplicas \pm SD. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) están señaladas con un asterisco (*). Abreviaturas: DO, densidad óptica.

2.4. Caracterización e identificación de las proteínas que inhiben el FXa en L3AsS y L3AsES

Con el objetivo de analizar la capacidad de las proteínas presentes en los extractos L3AsS y L3AsES para formar un complejo de inhibición estable con el FXa, se empleó

una electroforesis SDS-PAGE que permitiera visualizar el patrón de bandas de proteína de cada extracto en presencia y ausencia del FXa. Los geles resultantes revelaron que ambos extractos parasitarios contienen proteínas con capacidad para unir este factor. En ellos se hallaron dos bandas en los pocillos donde se depositó la mezcla preincubada de cada extracto con dicho factor que no estaban presentes en aquellos pocillos que contenían únicamente L3AsS o L3AsES. Estas bandas aparecían en un peso molecular superior (en torno a 31 y 34 kDa) al que mostraban en el pocillo incubado solamente con el FXa (en torno a 29 y 32 kDa, respectivamente) (bandas numeradas en la Figura 28). Asimismo, se observaron otros cambios en los geles resultantes de la electroforesis. En el caso de L3AsS, las bandas localizadas por debajo de 20 kDa y entre 23 y 28 kDa en la muestra preparada en presencia únicamente del extracto aparecieron menos teñidas o estuvieron ausentes en la mezcla preincubada. Con respecto a L3AsES, dos bandas (a 21,9 y 23,1 kDa) localizadas en la mezcla preincubada estuvieron ausentes o menos teñidas en la muestra preparada solamente en presencia del extracto (Figura 28).

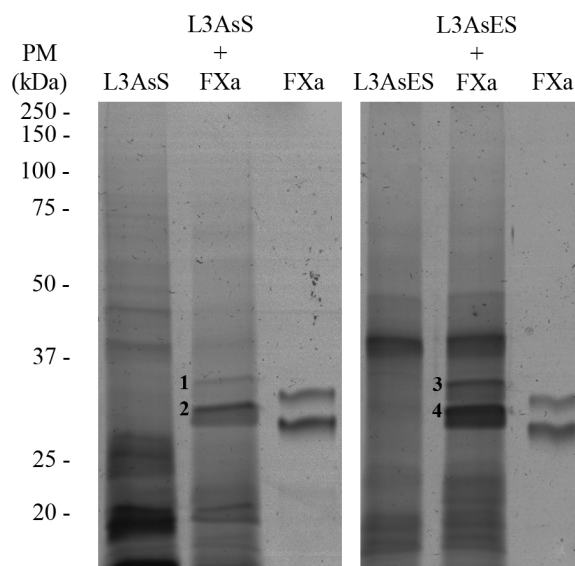


Figura 28. Unión del FXa a L3AsS y L3AsES por SDS-PAGE. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10 % con 10 µg del extracto parasitario (L3AsS o L3AsES), 10 µg del extracto parasitario + 1 µg del FXa o 1 µg del FXa preincubados en tampón 5 mM HEPES, pH 7,4. Las bandas numeradas corresponden al FXa en las muestras incubadas con L3AsS (1 y 2) y L3AsES (3 y 4). Abreviaturas: PM, peso molecular.

Para identificar los posibles inhibidores del FXa en los extractos L3AsS y L3AsES, las bandas seleccionadas que potencialmente contenían los complejos formados entre proteínas de estos extractos y el FXa en las mezclas preincubadas (bandas numeradas del 1 al 4 en la Figura 28), se escindieron de los geles y se analizaron por espectrometría de masas. Entre las diferentes proteínas del parásito que se identificaron

en las bandas analizadas se hallaron tres serpinas depositadas en la base de datos UniProt como proteínas de *A. suum*, que correspondieron a los identificadores F1L4J8_ASCSU (Serpina B6), F1L040_ASCSU (Proteína tipo serpina) y F1L2I5_ASCSU (Serpina B6) (Tabla 1). La primera de ellas procedía de L3AsS, la segunda de L3AsES y la serpina restante se encontró en ambos extractos parasitarios. Estos tres candidatos se identificaron en las bandas de mayor peso molecular analizadas, mientras que las bandas de menor peso molecular no revelaron ninguna serpina. En las cuatro bandas analizadas también se identificó el FX de *Homo sapiens*, que correspondía al factor de la coagulación utilizado para realizar este ensayo (ver apartado 2.6.1 de la sección «Materiales y Métodos»). Todas las proteínas se identificaron con un porcentaje de confianza del 99 % en ProteinPilot según la siguiente ecuación: $\text{ProtScore} = -\log(1-(\text{porcentaje de confianza}/100))$.

Tabla 1. Serpinas identificadas por espectrometría de masas en las bandas de las L3As analizadas. Todas las identificaciones pertenecen a proteínas de *A. suum* depositadas en bases de datos. El número de banda corresponde al indicado en la Figura 28. Abreviaturas: PM, peso molecular; aa, aminoácidos.

Número de banda	Extracto parasitario	Código de acceso (UniProt)	Descripción	PM teórico (kDa)	Longitud (aa)	Sitio de escisión (aa)	Dominio firma (aa)
1	L3AsS	F1L4J8_ASCSU	Serpina B6	41,4	370	–	FIADHPFLFAV (347-357)
3	L3AsES	F1L040_ASCSU	Proteína tipo serpina	36,7	323	–	FTADHPFLFAI (304-314)
1, 3	L3AsS, L3AsES	F1L2I5_ASCSU	Serpina B6	42,3	373	22-23	–

Los análisis bioinformáticos realizados a partir de las secuencias de aminoácidos de las proteínas seleccionadas permitieron conocer el sitio de escisión del péptido señal y la secuencia firma de la serpina en una y dos proteínas, respectivamente. Estos datos, junto con el código de acceso de las proteínas a UniProt, su descripción, peso molecular teórico y la longitud de su secuencia de aminoácidos están recogidos en la Tabla 1. Las tres serpinas identificadas se compararon mediante alineamiento de secuencia múltiple con el inhibidor fisiológico del FXa en mamíferos, la antitrombina III, de las especies *Sus scrofa domesticus* y *H. sapiens* (códigos de acceso a UniProt: Q7M364_PIG y ANT3_HUMAN, respectivamente) (Figura 29). Los resultados obtenidos revelaron porcentajes de similitud de entre 31,18 % y 36,56 % en el caso de *S. s. domesticus* y de entre 29,03 % y 35,42 % para *H. sapiens*. Este análisis también se empleó para comparar los dominios firma de las serpinas F1L4J8_ASCSU y F1L040_ASCSU con el de la

antitrombina III. En este caso, los resultados mostraron porcentajes de similitud de 45,45 % y 54,55 % entre el dominio firma del inhibidor fisiológico del FXa en mamíferos y los de las serpinas identificadas en los extractos L3AsS y L3AsES, respectivamente.

```

tr|Q7M364|Q7M364_PIG          -----HWSPVEDICTAKPRDIPVNPNCIYRSPEK 29
sp|P01008|ANT3_HUMAN          MYSNVIGTVTSGKRKVVLLSLLLIGFWDVCVTHGSPVDICTAKPRDIPMNPNCIYRSPEK 60
tr|F1L4J8|F1L4J8_ASCSU      -----MFASP-- 5
tr|F1L040|F1L040_ASCSU      ----- 0
tr|F1L2I5|F1L2I5_ASCSU      -----MRISSCDLFLVLLLLL-----ISSYSHNKYCCGLTR-- 32

tr|Q7M364|Q7M364_PIG          KATEGEGSEQKIPEATNRRVWELSKANSHFATIFYQHLADSKNDNDNIFLSPLSISTAFA 89
sp|P01008|ANT3_HUMAN          KATEGEGSEQKIPEATNRRVWELSKANSRFATTFYQHLADSKNDNDNIFLSPLSISTAFA 120
tr|F1L4J8|F1L4J8_ASCSU      -----IATAQANFALDLLKHSIDED---QSSVISPFSVAIALA 40
tr|F1L040|F1L040_ASCSU      ----- 0
tr|F1L2I5|F1L2I5_ASCSU      -----LDVAQANFALDLLRKSGADNSTYKSAFLSPFSVALTLA 70

tr|Q7M364|Q7M364_PIG          MTKLGACDNTLKQLMEVFKFDTISEKTSQVHFFFAKLNCRLYRKANKSSELVANSANRFG 149
sp|P01008|ANT3_HUMAN          MTKLGACDNTLQQLMEVFKFDTISEKTSQIHFFFAKLNCRLYRKANKSSKLVANSANRFG 180
tr|F1L4J8|F1L4J8_ASCSU      MTYAGADGKTKQEMNEALAKGLP----DSEIHEHFAKLVDEL-SKPADGYALSTANRLYI 95
tr|F1L040|F1L040_ASCSU      --MLVRSNDNTYKQMNVDLAGGAS---DKEFNDHFGKLLQEL-SQSRSGYELSSANKLFI 53
tr|F1L2I5|F1L2I5_ASCSU      MTYAGAMDNTYKQMNIDLAGGAS---DREFNEHFSKLLQEL-SQPNKYSKMS:SGNKVFI 125
      ..*   :: : : . . . . . . : : : .*.**  .*  : : : : : : : : : : : :

tr|Q7M364|Q7M364_PIG          DKSLTFNETYQEISEVVYGAQLQPLDFKENAQQSRGIINQWVSNKTEGRITDVPPEAIN 209
sp|P01008|ANT3_HUMAN          DKSLTFNETYQDISELVYGAQLQPLDFKENAQQSRAAINKWVSNKTEGRITDVPSEAIN 240
tr|F1L4J8|F1L4J8_ASCSU      DQRLSLKDAFMSLIKNKYAGQLQAADFKQAAI-VANEINTWVESQTNMISKDLVHPDKIT 154
tr|F1L040|F1L040_ASCSU      KKGFSLKETYLEIIRSVYGGLLQVDFSQADA-VASEINNEWVERQTSKINTLVQPEMFD 112
tr|F1L2I5|F1L2I5_ASCSU      KKGIDLKESYRNIQTLYGGQLEQVDFSQRIA-AANVINDWVANETNSKIKQIIEPYMLP 184
      . : : : : : . : . *.. * : ** : . . . . . * : * : : : : :

tr|Q7M364|Q7M364_PIG          ELTVLVLVNTIYFKGRWKSFKFSSENTRKFELFYKANGESCSCVSMYQESKFRYRRVAEGTQ 269
sp|P01008|ANT3_HUMAN          ELTVLVLVNTIYFKGLWKSFKFSPENTRKFELFYKADGESCSCASMMYQEGKFRYRRVAEGTQ 300
tr|F1L4J8|F1L4J8_ASCSU      DDSRLTLVNAVYFKGDWANKFDEANTAKKLFYTTADRHREVDMMRIKDKFNVE-DPDWQ 213
tr|F1L040|F1L040_ASCSU      DLTRMVLVNAIYFKGLWNIETESQTRKAIFYEKEGATRQVDMMSVKANYPHYQ-NEKVQ 171
tr|F1L2I5|F1L2I5_ASCSU      ELTRMILVNAVYFSGTWKNIFFKSTAQKAFYEANGATRAVDMMWINNYFPYYA-NDKVQ 243
      . : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

tr|Q7M364|Q7M364_PIG          VLELPFKGDDITMVLILPKLEKSLAKVEQELTPEVLQEWLDELADTLVHVMMPFRFRIEDS 329
sp|P01008|ANT3_HUMAN          VLELPFKGDDITMVLILPKPEKSLAKVEKELTPEVLQEWLDELEEMMLVHVMMPFRFRIEDG 360
tr|F1L4J8|F1L4J8_ASCSU      TLGLPYKNGEVYMYFFLPKERFGLGKQLKVLQDGRIMEMIGDCDNLEVEVELPKFKLEKK 273
tr|F1L040|F1L040_ASCSU      VLGLPYKNEVYMYVFLPREKYGLAAFEESLNGQMLEMIRNASSNEVIEVLPKFKLEKR 231
tr|F1L2I5|F1L2I5_ASCSU      VLGLPYKNEVYMYVFLPREKYGLAALEESLGGQMLEMIHNTTRQVVELPKFKLEKER 303
      .* ** : . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

tr|Q7M364|Q7M364_PIG          FSVKERLQDMGLEDLFIPEKAKLPGIVAEGRDDLYVSDAFHKAFLVEVNEEGSEAAAATAI 389
sp|P01008|ANT3_HUMAN          FSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDAFHKAFLVEVNEEGSEAAAATAV 420
tr|F1L4J8|F1L4J8_ASCSU      LELVEITLKLKLGIEEAFSQASADFSGISD---APLCISDVIHKAFIEVNEEGTEAAAATLV 330
tr|F1L040|F1L040_ASCSU      FSLVSALAKLGIIDAFGD-SANFSGISD---VPLKISNVIHKAFIEVNEEGTEAAAATAV 287
tr|F1L2I5|F1L2I5_ASCSU      FNVVNLKKGITDAFGD-SANFNGISD---VPLKISDIIHRAFIEVDENGTGKAGIAKTK 359
      . : . * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

tr|Q7M364|Q7M364_PIG          GIAGRS-LNPAR--VTFKANRPFLVLIREVALNTIIFMGRVANPC-- 431
sp|P01008|ANT3_HUMAN          VIAGRS-LNPNR--VTFKANRPFLVFIREVPLNTIIFMGRVANPCVK 464
tr|F1L4J8|F1L4J8_ASCSU      GMQLRCAARPPRIPLKFIADHPFLFA--VVKDSTILFIGQFA----- 370
tr|F1L040|F1L040_ASCSU      LMIRKTSVQIKRRPIRFTADHPFLFA--IVKGNITLFI----- 323
tr|F1L2I5|F1L2I5_ASCSU      KT----YIH-----IRIQNDQLF----- 373
      . : : : *
    
```

Similitud (%)			Similitud (%)		
Secuencia completa	Q7M364_PIG	ANT3_HUMAN	Dominio firma	Q7M364_PIG	ANT3_HUMAN
F1L4J8_ASCSU	35.15	35.42	F1L4J8_ASCSU	45.45	45.45
F1L040_ASCSU	36.56	35.00	F1L040_ASCSU	54.55	54.55
F1L2I5_ASCSU	31.18	29.03	F1L2I5_ASCSU	-	-

Figura 29. Alineamiento de secuencia múltiple. Alineamiento de las serpinas de las L3As identificadas por espectrometría de masas (F1L4J8_ASCSU, F1L040_ASCSU y F1L2I5_ASCSU) con la antitrombina III de *S. s. domesticus* (Q7M364_PIG) y *H. sapiens* (ANT3_HUMAN). Los aminoácidos conservados en todas las secuencias están marcados con asteriscos (*), mientras que las sustituciones conservativas y semiconservativas están señaladas con dos (:) y un punto (.), respectivamente. En las tablas se indica el porcentaje de similitud tanto de las secuencias completas como de los dominios firma entre las serpinas de las L3As y la antitrombina III de cerdo (Q7M364_PIG) y humano (ANT3_HUMAN). Los dominios firma de las serpinas están marcados en color amarillo.

2.5. L3AsS y L3AsES unen plasminógeno

El plasminógeno es el precursor de la plasmina, enzima responsable de degradar la fibrina que forma parte del coágulo sanguíneo y, por tanto, representa la proteína central del sistema fibrinolítico. Para analizar si los extractos L3AsS y L3AsES tenían capacidad para fijar plasminógeno, se llevó a cabo un ELISA. Los resultados de este ensayo revelaron que ambos extractos parasitarios son capaces de unir plasminógeno. Esto es debido a que los valores de densidades ópticas obtenidos en aquellos pocillos en los que dicha molécula se incubó con cada extracto parasitario y anticuerpos específicos fueron significativamente más elevados que los que mostraron los controles negativos, en los que se sustituyó cada extracto por una cantidad igual de BSA ($p < 0,05$) (Figura 30). El empleo de cantidades crecientes de plasminógeno permitió observar, además, que esta unión es directamente proporcional a la cantidad disponible de dicha molécula. Asimismo, el ensayo de competición en el que se incluyó ϵ -ACA como análogo de la lisina en la incubación con el plasminógeno reveló valores similares a los del control negativo para ambos extractos, lo que sugiere que los potenciales receptores del plasminógeno de los extractos L3AsS y L3AsES utilizan residuos de este aminoácido para llevar a cabo dicha interacción (Figura 30).

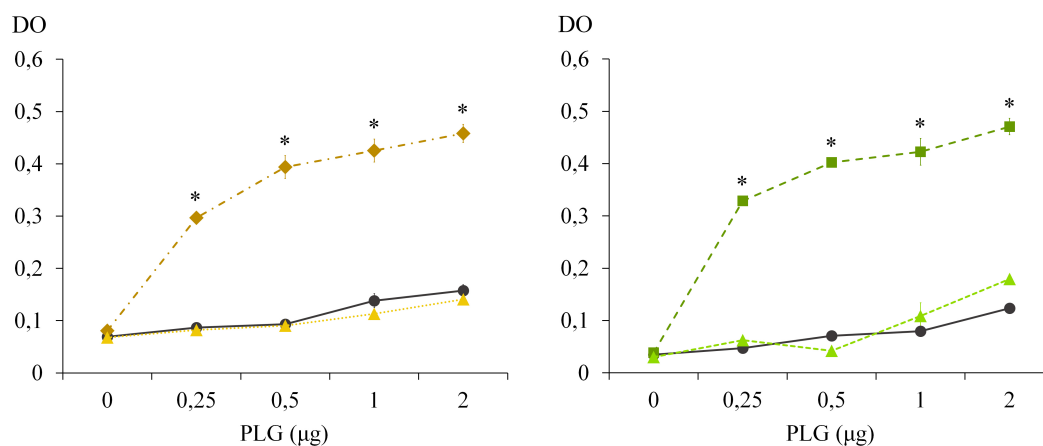


Figura 30. Unión del plasminógeno a L3AsS (♦) y L3AsES (■) por ELISA. Incubación de 1 µg del extracto parasitario (L3AsS o L3AsES) o BSA como control negativo (●) con cantidades de plasminógeno crecientes (0-2 µg). Ensayo de competición con 25 mM ϵ -ACA durante la incubación de L3AsS (▲) y L3AsES (▲) con el plasminógeno. Cada punto representa la media de tres réplicas \pm SD. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) están señaladas con un asterisco (*). Abreviaturas: DO, densidad óptica; PLG, plasminógeno.

Con el objetivo de validar este resultado, la unión del plasminógeno por L3AsS y L3AsES se corroboró y caracterizó por *Western blot*. Así, las proteínas de cada extracto

se separaron por electroforesis, se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con plasminógeno y anticuerpos específicos. De esta manera, ambos extractos parasitarios revelaron bandas de unión a plasminógeno que estaban ausentes en el control negativo, en el que se omitió la presencia de L3AsS y L3AsES (Figura 31). La electroforesis SDS-PAGE mostró aproximadamente 30 bandas para L3AsS y 20 para L3AsES, distribuidas en un amplio intervalo de pesos moleculares (entre 10 y 100 kDa), de las que 12 (10-75 kDa) y 5 (30-75 kDa), respectivamente, se revelaron como bandas de unión a plasminógeno en el *Western blot* (Figura 31).

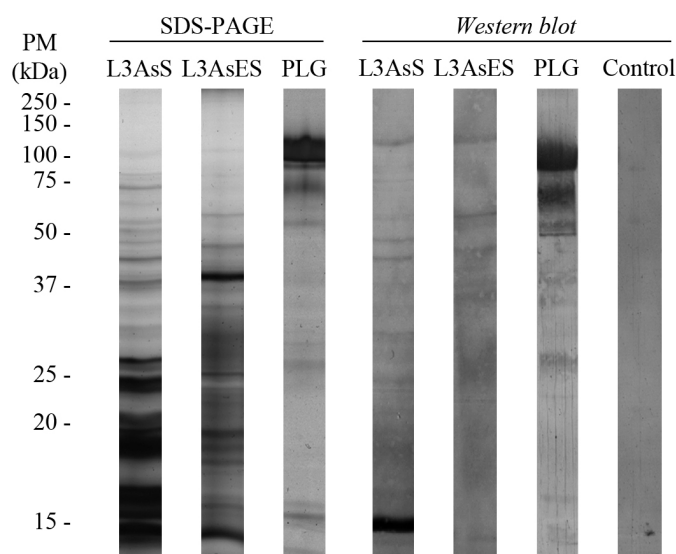


Figura 31. Unión del plasminógeno a L3AsS y L3AsES por *Western blot*. A la izquierda, SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12 % con 15 µg de L3AsS, 15 µg de L3AsES o 2 µg de PLG. A la derecha, *Western blot* de las muestras anteriores incubado con 10 µg/mL de plasminógeno. Para el control negativo se omitió la presencia de cualquier proteína durante la electroforesis. Abreviaturas: PM, peso molecular; PLG, plasminógeno.

2.6. Unión del plasminógeno a la superficie de las L3As

Como complemento a los resultados descritos en el punto anterior, se llevó a cabo un experimento de inmunolocalización aplicando técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal para analizar si la fijación del plasminógeno se producía en la superficie de las L3As. Como puede observarse en la Figura 32, la unión del plasminógeno se revela en la superficie de las L3As, principalmente en la parte anterior del cuerpo, unión que no se muestra cuando se omite la incubación de las L3As con el plasminógeno en el control negativo. El ensayo de competición llevado a cabo en presencia de ϵ -ACA mostró una unión mucho menor a la del ensayo que se realizó en su

ausencia, sugiriendo de nuevo la participación de los residuos de lisina de las proteínas de las L3As en la fijación del plasminógeno (Figura 32).

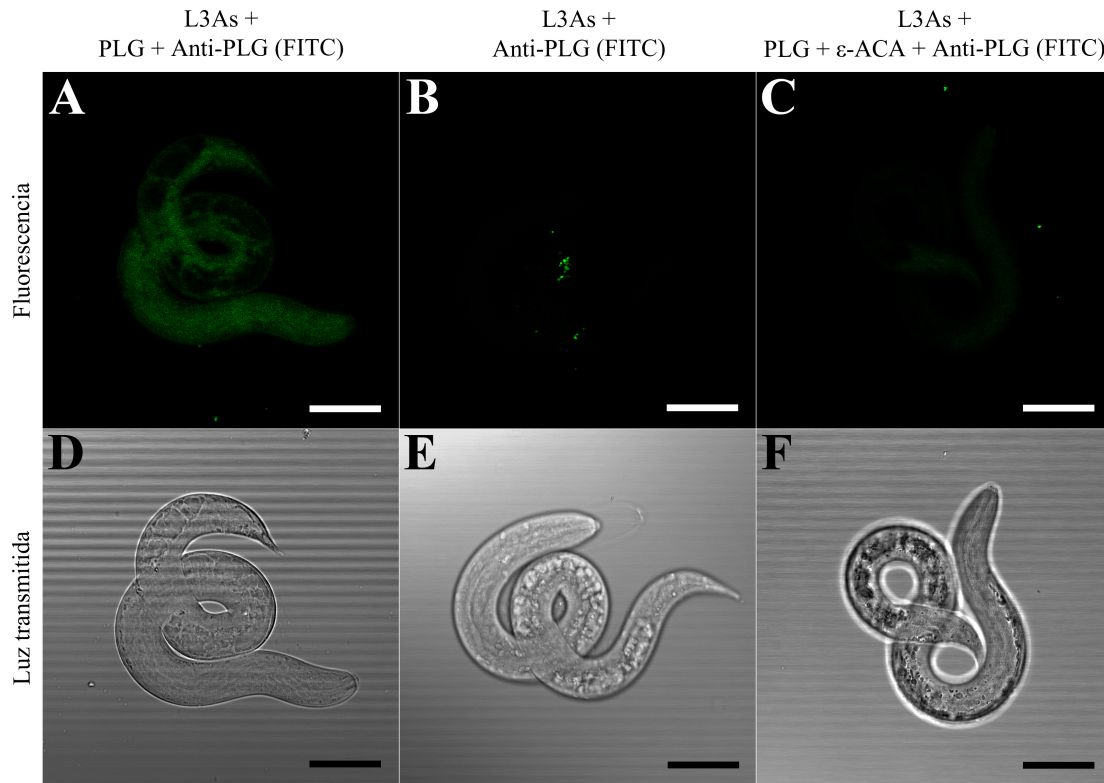


Figura 32. Unión del plasminógeno a la superficie de las L3As por inmunofluorescencia y microscopía confocal. (A-C) Imágenes de fluorescencia de la superficie de las L3As: (A) Incubación de las L3As con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PLG y un anticuerpo anti-PLG unido a FITC; (B) Control negativo omitiendo la presencia de PLG en el ensayo anterior; (C) Ensayo de competición con 40 mM ϵ -ACA durante la incubación con el PLG. (D-F) Imágenes de luz transmitida de la superficie de las L3As correspondientes a A-C. Barras de escala: 25 μm . Abreviaturas: PLG, plasminógeno.

2.7. L3AsS y L3AsES activan el plasminógeno y promueven la generación de plasmina

Para comprobar si la unión del plasminógeno llevada a cabo por los extractos L3AsS y L3AsES era funcionalmente relevante y, por tanto, promovían su activación y la consecuente generación de plasmina, se realizó un ensayo en el que la actividad proteolítica de dicha enzima liberada podía ser medida tras la adición de un cromógeno específico. Los resultados mostraron que ambos extractos parasitarios activan el plasminógeno y promueven la generación de plasmina en presencia de los dos principales activadores fisiológicos del plasminógeno (tPA y uPA). Esto se debe a que los valores de densidades ópticas obtenidos para L3AsS y L3AsES en estos casos fueron significativamente más elevados que los que revelaron sus controles negativos, en los que

se sustituyó cada extracto parasitario por una cantidad igual de BSA ($p < 0,05$) (Figura 33). Al comparar los resultados obtenidos para ambos activadores se observó que la activación del plasminógeno en presencia del tPA es más elevada para L3AsS, mientras que en presencia del uPA es mayor para L3AsES. El extracto L3AsS mostró, además, cierta capacidad para activar el plasminógeno de manera autónoma, ya que cuando dicho extracto se incubó en ausencia de los activadores tPA y uPA se hallaron diferencias significativas en los valores de densidades ópticas obtenidos entre este grupo experimental y su control negativo ($p < 0,05$) (Figura 33).

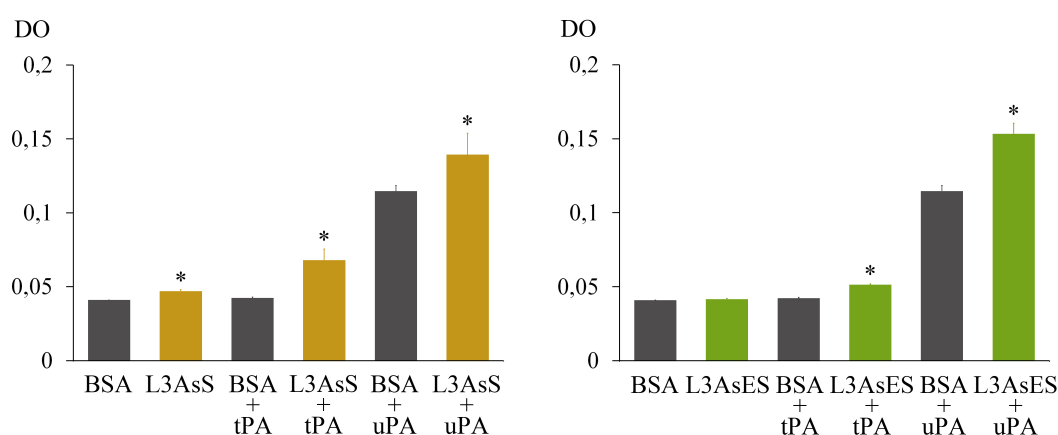


Figura 33. Activación del plasminógeno y potenciación de la generación de plasmina por L3AsS (■) y L3AsES (■). Incubación de 1 μ g del extracto parasitario (L3AsS o L3AsES) o BSA como control negativo (■) con 1 μ g de plasminógeno, 3 μ g de S-2251 y un activador del plasminógeno (15 ng de tPA o 10 ng de uPA). Cada barra representa la media de tres réplicas \pm SD. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los ensayos experimentales y los grupos control situados a su izquierda están señaladas con un asterisco (*). Abreviaturas: DO, densidad óptica.

2.8. Caracterización e identificación de las proteínas que unen plasminógeno en L3AsS y L3AsES

Para caracterizar e identificar las proteínas responsables de la unión del plasminógeno en L3AsS y L3AsES, los componentes proteicos de ambos extractos parasitarios se separaron por electroforesis 2D. A continuación, parte de los geles resultantes se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales se incubaron con plasminógeno y anticuerpos específicos. El gel 2D de L3AsS reveló 560 *spots* con puntos isoeléctricos entre 3,3 y 9,7 y pesos moleculares entre 12 y 176 kDa (Figura 34A). El *Western blot* correspondiente mostró 54 *spots* con capacidad para unir plasminógeno, con puntos isoeléctricos entre 5,1 y 9,5 y pesos moleculares entre 13,7 y 176 kDa (Figura 34B), representando una tasa de unión a plasminógeno del 9,64 % del total de *spots*

revelados en el gel de poliacrilamida. El gel 2D de L3AsES reveló un número de *spots* inferior (387), los cuales se distribuyeron en un intervalo menor tanto de puntos isoeléctricos (3,7-8,9) como de pesos moleculares (13,5-158 kDa) (Figura 34C). En este caso, en el *Western blot* correspondiente se revelaron 16 *spots* con capacidad para unir plasminógeno, con puntos isoeléctricos entre 5,1 y 7,1 y pesos moleculares entre 48 y 109 kDa (Figura 34D), representando una tasa de unión a plasminógeno del 4,13 %. En el *Western blot* llevado a cabo en ausencia de plasminógeno como control negativo no se reveló ningún *spot*.

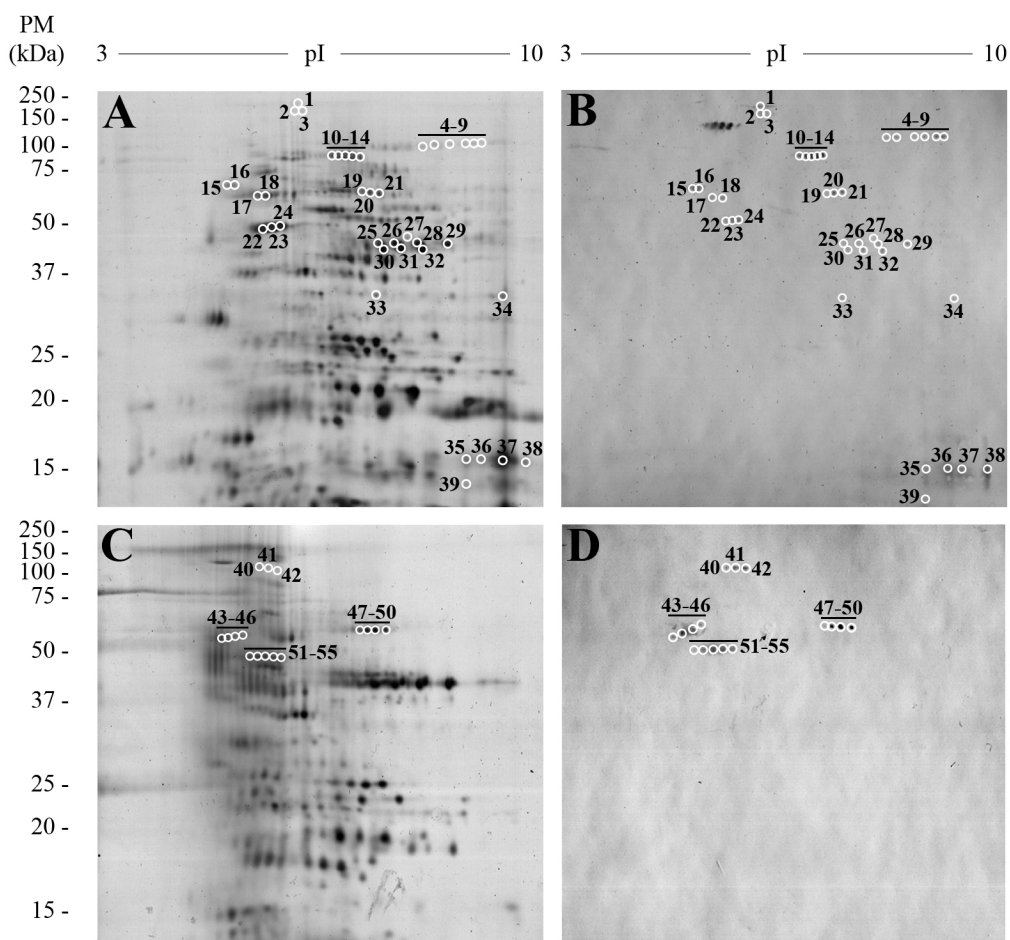


Figura 34. Imágenes 2D de L3AsS (A y B) y L3AsES (C y D). (A y C) Geles 2D al 12 % de poliacrilamida y un intervalo de pH de 3-10 revelados con nitrato de plata. (B y D) Membranas reveladas en el *Western blot* homólogas a los geles a A y C que muestran los *spots* de unión al plasminógeno de los extractos parasitarios. La referencia de peso molecular está indicada a la izquierda y la de punto isoeléctrico, sobre las imágenes de los geles y membranas. Los *spots* rodeados y numerados corresponden a los *spots* de unión al plasminógeno identificados conjuntamente en el *Western blot* y en su gel 2D homólogo. Abreviaturas: PM, peso molecular; pI, punto isoeléctrico.

Tabla 2. Proteínas de unión al plasminógeno identificadas por espectrometría de masas en los *spots* de las L3As analizados. Todas las identificaciones pertenecen a proteínas de *A. suum* depositadas en bases de datos. El número de *spot* corresponde al indicado en la Figura 34. Abreviaturas: PM, peso molecular; pI, punto isoeléctrico.

Número de <i>spot</i>	Extracto parasitario	Código de acceso (NCBI)	Descripción	PM teórico (kDa)	pI teórico	Función molecular	Proceso biológico
1	L3AsS	ERG85667	Miembro 6 de la subfamilia p55 de MAGUK	128,3	7,8	Actividad de unión	–
12, 13	L3AsS	Q05893	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	72,2	6,3	Actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	Gluconeogénesis
15, 16	L3AsS	CAK18211	Disulfuro isomerasa	55,6	4,9	Actividad proteína disulfuro isomerasa	Homeostasis del redox celular
18	L3AsS	ERG82657	Subunidad ATP sintasa	58,8	5,7	Actividad transportador transmembrana de protones	Transporte de protones acoplado a la síntesis de ATP
20, 21, 49, 50	L3AsS, L3AsES	ERG85026	Glucosa-6-fosfato isomerasa	80,1	9,1	Actividad glucosa-6-fosfato isomerasa	Proceso glucolítico
23, 24, 36	L3AsS	ERG87158	Actina-2	41,8	5,3	Actividad de unión	Organización del citoesqueleto de actina
26, 28, 29	L3AsS	ERG79663	Fructosa-bisfosfato aldolasa 1	39,1	7,1	Actividad fructosa-bisfosfato aldolasa	Proceso glucolítico
31, 32	L3AsS	ERG79426	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	38,5	7,7	Actividad gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Proceso glucolítico
33, 34	L3AsS	ERG81473	Lectina de 32 kDa de unión a beta-galactósido	31,8	6,4	Unión de carbohidratos	–
35, 38	L3AsS	ERG81802	Proteína ribosómica 60s L23	14,8	10,5	Componente estructural del ribosoma	Traducción
41, 42	L3AsES	ERG86435	Proteína 25 portadora de un dominio similar a prion	141,5	7,3	Actividad catalítica	Proceso metabólico de carbohidratos
44, 45, 51, 52, 54, 55	L3AsES	ERG85099	Receptor 99d de péptidos similares a taquiquinina	87,8	4,9	Actividad receptor acoplado a proteína G	–

La comparación de los *spots* revelados en los *Western blot* con sus homólogos en los geles de poliacrilamida permitió seleccionar 41 y 16 *spots* de unión al plasminógeno en los proteomas de L3AsS y L3AsES, respectivamente. De ellos, un total de 30 *spots* (20 de L3AsS y 10 de L3AsES) se escindieron de los geles 2D y se analizaron por espectrometría de masas. Se lograron identificar todos ellos, los cuales correspondieron a 12 proteínas depositadas en las bases de datos como proteínas de *A. suum*: miembro 6 de la subfamilia p55 de MAGUK, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, disulfuro isomerasa,

subunidad ATP sintasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, actina-2, fructosa-bisfosfato aldolasa 1, GAPDH, lectina de 32 kDa de unión a beta-galactósido, proteína ribosómica 60s L23, proteína 25 portadora de un dominio similar a prion y receptor 99d de péptidos similares a taquiquina. Se identificaron entre 1 y 6 isoformas de cada una de ellas. Nueve proteínas procedían del extracto L3AsS, 2 proteínas provenían de L3AsES y una se halló en ambos extractos parasitarios. En la Tabla 2 se recogen los datos de las proteínas identificadas referentes a su código de acceso al NCBI, peso molecular teórico, punto isoeléctrico teórico, función molecular y proceso biológico en el que participan. Cinco de las 12 proteínas identificadas (42 %) están relacionadas con rutas metabólicas, de las cuales 4 (33 %) participan en procesos glucolíticos.

Finalmente, con el objetivo de visualizar la estructura 3D de las proteínas identificadas como proteínas de unión al plasminógeno en L3AsS y L3AsES, las secuencias aminoacídicas de dichas proteínas se analizaron bioinformáticamente para buscar moldes homólogos depositados en las bases de datos. Así, se predijo la estructura secundaria de dichas proteínas y sus modelos 3D *in silico*, los cuales se muestran en la Figura 35. Además, en ellos se marcaron los residuos de lisina como posibles sitios de unión al plasminógeno, los cuales se visualizaron en la parte externa de las proteínas.

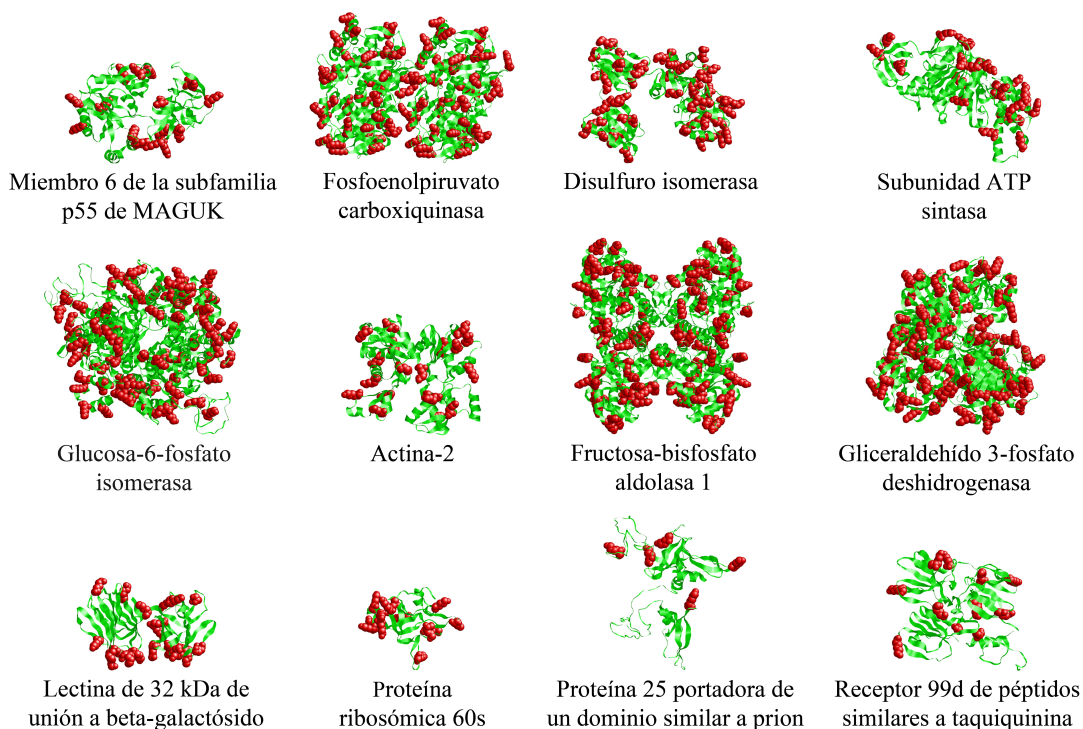


Figura 35. Modelos 3D de las proteínas de unión al plasminógeno identificadas en las L3As por espectrometría de masas. Los residuos de lisina de las proteínas como posibles sitios de unión al plasminógeno aparecen marcados con bolas de color rojo.

DISCUSIÓN

Conocer y entender las relaciones moleculares que ocurren entre los parásitos y sus hospedadores es fundamental para lograr un control efectivo de las enfermedades parasitarias. Pese al incremento de la actividad investigadora que existe actualmente en el campo de la parasitología, la enorme complejidad que implica este tipo de interacciones biológicas hace que las estrategias dirigidas a su prevención y tratamiento continúen siendo escasas o acarreen serios inconvenientes. En este sentido, el desarrollo de nuevas estrategias de control vacunal se ha señalado como una posible solución a estos problemas, para lo cual resulta esencial desentrañar las bases moleculares que gobiernan las relaciones parásito-hospedador, principalmente en las fases tempranas de la infección (11,319,320). Aunque el conocimiento científico generado en torno a estas interacciones debe considerarse y comprenderse en su conjunto, es necesario compartimentarlas cuando se pretende abordar su estudio pormenorizado. En este contexto, la presente Tesis Doctoral trata de contribuir al conocimiento sobre las interacciones moleculares que se producen entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados. Esta premisa implica, tanto la realización de una revisión de alcance sobre la información generada en dicho campo de estudio, como el análisis de la interacción de la larva de tercer estadio de *Ascaris suum* con componentes del sistema hemostático de su hospedador.

La cuantiosa información que existe sobre la interacción que se produce entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados, su diversidad y su dispersión en la literatura científica llevaron a enunciar el primer objetivo de la Tesis Doctoral y realizar la consiguiente revisión de alcance. El análisis de los datos obtenidos en dicha revisión reveló un número considerable de especies de helmintos parásitos, sanguíneos y tisulares, con capacidad para interactuar con el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados. Se observó que las distintas especies de parásitos comparten estrategias de interacción, pues emplean moléculas equivalentes para manipular los mismos componentes del sistema hemostático. El hecho de que especies que pertenecen a taxones tan distantes, como platelmintos y nematodos (321), y que parasitan tan amplia variedad de hospedadores compartan mecanismos similares para interactuar con el sistema hemostático, denota su importancia y convergencia evolutiva, como ya se ha postulado para esta y otras adaptaciones parasitarias (1,2,322,323). Además de los helmintos, también protozoos y artrópodos parásitos, e incluso bacterias y hongos patógenos, interactúan molecularmente con este sistema del

hospedador (324,325), lo que apoya la aseveración anterior en términos de significación biológica y evolutiva.

Los resultados obtenidos también revelaron un número elevado de proteínas parasitarias con capacidad para interactuar con el sistema hemostático. Muchas de estas proteínas estaban implicadas en los mismos tipos de interacciones, lo que sugiere que los helmintos parásitos emplean diferentes moléculas para efectuar la misma función, tal y como han postulado otros autores (10,323,326). Estos procesos de redundancia bioquímica son actualmente considerados como una de las principales razones por las que el desarrollo de vacunas contra las helmintiasis constituye un reto de difícil solución (10). Por otra parte, se observó que, en muchos casos, la misma proteína parasitaria interactuaba con diferentes componentes del sistema hemostático, participando así en distintos tipos de interacciones. Aparte de estas funciones relacionadas con la manipulación del sistema hemostático del hospedador, para la mayoría de las proteínas recogidas en la revisión se han descrito otras funciones, que se consideran primordiales o prioritarias. Este mecanismo de multifuncionalidad es conocido como «*moonlighting*» y constituye una estrategia de ahorro energético basada en la capacidad para exhibir diferentes funciones de una misma proteína dependiendo de ciertos factores, como su expresión en distintos tipos celulares, su localización en el interior o el exterior de la célula o en distintos compartimentos celulares o su secreción a través de rutas convencionales o alternativas (327,328). En efecto, la mayoría de las interacciones recogidas en la revisión se describieron en componentes parasitarios procedentes de los compartimentos de superficie y excretor/secretor. Esto sugiere que las moléculas parasitarias implicadas en la manipulación del sistema hemostático serían, principalmente, expresadas en la superficie del parásito o secretadas a su exterior desde el citoplasma celular, pese a que sus funciones canónicas se lleven a cabo en el interior de la célula. La localización de estas moléculas en la interfase parásito-hospedador podría favorecer su interacción con las moléculas del hospedador y permitir al parásito beneficiarse del resultado de la interacción en su entorno inmediato o en aquellos lugares en los que pueda ser requerido.

Dentro del sistema hemostático, el término «*moonlighting proteins*» ha sido especialmente atribuido a las proteínas que interactúan con el sistema fibrinolítico, y más concretamente, a aquellas cuya función principal es actuar como enzimas catalíticas en la glucólisis (323,329-331). A este respecto, los resultados de la revisión de alcance

recogida en la presente Tesis Doctoral mostraron que las enolasas, las GAPDH y las fructosa-bisfosfato aldolasas eran las proteínas parasitarias más frecuentemente identificadas como fijadoras del plasminógeno. Otras proteínas relacionadas con la glucólisis que revelaron esta misma capacidad fueron la fosfoglicerato mutasa y la triosa fosfato isomerasa. Todas ellas no solo actúan como receptores del plasminógeno en helmintos parásitos, sino que también han sido identificadas llevando a cabo esta función en protozoos parásitos y en bacterias y hongos patógenos (325). Entre el resto de proteínas que mostraron capacidad para unir plasminógeno destacaron la actina y la anexina por identificarse en varias especies de helmintos, las cuales también presentan funciones adicionales a la fijación del plasminógeno, aunque no están relacionadas con la glucólisis. Entre los principales receptores celulares a los que se puede unir el plasminógeno en los vertebrados se encuentran la α -enolasa y la anexina 2 (260), lo que sugiere que los parásitos podrían utilizar como receptores del plasminógeno moléculas similares a las expresadas como receptores fisiológicos en los hospedadores vertebrados. Asimismo, se ha postulado que el mecanismo de unión del plasminógeno podría ser similar para los receptores de ambos tipos de organismos (329). Tanto en el hospedador como en el parásito, este mecanismo está mediado por residuos carboxiterminales de lisina presentes en los receptores, que interaccionan con los sitios de unión a lisina situados en los dominios *kringle* del plasminógeno (332). Por ello, esta característica de la unión del plasminógeno puede ser demostrada experimentalmente mediante ensayos de competición con análogos de lisina, como el ϵ -ACA.

Aunque el término «*moonlighting proteins*» no se ha relacionado con moléculas parasitarias que interaccionan con el sistema de la coagulación, algunas de las proteínas recogidas en la revisión, como la anexina, la calpaína, la calreticulina y la ectonucleótido fosfodiesterasa/pirofosfatasa, presentan otras funciones consideradas primordiales o prioritarias dentro de la fisiología parasitaria y no relacionadas con la interacción aquí revelada (333). Otras proteínas (proteínas o péptidos anticoagulantes de *Ancylostoma* spp., proteínas de tipo Kunitz y serpinas), responsables de la mayor parte de las interacciones identificadas con el sistema de la coagulación, exhiben actividad inhibitoria de endopeptidasas de tipo serina (333). Este hecho resulta llamativo al observar que la mayoría de las proteínas que participan en la coagulación sanguínea en vertebrados son proteasas de serina y sus principales inhibidores (la antitrombina III y el TFPI) son una serpina y un inhibidor de tipo Kunitz, respectivamente (239). Además, estudios de

comparación entre las secuencias de las serpinas de nematodos y mamíferos han señalado que ambas comparten algunos de los aminoácidos clave para mantener la estructura y función de las proteínas (322). Queda aún por determinar si este sería el caso de las serpinas de helmintos parásitos implicadas en la manipulación del sistema hemostático del hospedador.

Con arreglo a la información contenida en las publicaciones analizadas en la citada revisión de alcance, las interacciones entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados se relacionaron, principalmente, con la capacidad de los parásitos para evitar la formación de coágulos sanguíneos (potencial anticoagulante) y facilitar su disolución (potencial profibrinolítico). Estas estrategias parasitarias se asociaron con los requerimientos nutricionales y los mecanismos de supervivencia del parásito, respectivamente, por lo que podrían ser especialmente beneficiosas para aquellos parásitos que se alimentan de sangre, como los estadios adultos de *Ancylostoma* spp., *Fasciola hepatica* y *Haemonchus contortus*, o que viven en el sistema circulatorio de su hospedador (p. ej. *Dirofilaria immitis* y *Schistosoma* spp.). En efecto, se ha observado que el sangrado provocado por algunos parásitos hematófagos continúa desde los vasos sanguíneos afectados durante periodos de tiempo prolongados tras el desprendimiento del patógeno (334) y que parásitos que viven en el sistema circulatorio de su hospedador durante años no desencadenan la formación de trombos, los cuales sí aparecen cuando el parásito muere (335,336). Asimismo, se ha sugerido que la formación de coágulos sanguíneos en el hospedador constituiría una barrera física para parásitos que migran a través de sus tejidos, que viven en su sistema circulatorio o que se alimentan de sangre (323).

Además de evitar la formación de coágulos sanguíneos, la manipulación del sistema hemostático del hospedador podría proporcionar otros beneficios importantes a los parásitos debido a que este sistema participa en otros procesos fisiológicos en los vertebrados. El sistema de la coagulación es considerado un importante sistema defensivo, al activarse durante las infecciones y al incluir componentes que están implicados en la respuesta inmune y su regulación (337). En la evasión y modulación de las respuestas defensivas del hospedador también podría jugar un papel importante la plasmina generada tras la activación del sistema fibrinolítico, al ejercer su actividad proteolítica sobre diversas inmunoglobulinas y componentes del complemento, como se ha demostrado para algunas especies de bacterias patógenas (338-341). La plasmina

también está implicada en la degradación de matriz extracelular, bien directamente al degradar sus propios componentes, bien de forma indirecta al activar metaloproteasas de matriz (276). Asimismo, participa en procesos de proliferación y migración celular y en la activación de factores angiogénicos, contribuyendo a la patogénesis del cáncer y de diversas enfermedades con componente inflamatorio (276,299,300). La participación de la plasmina en estos procesos hace que la activación del sistema fibrinolítico por bacterias patógenas también se haya relacionado con procesos de adhesión, invasión y migración (342-346), así como con la degradación de proteínas del hospedador para la nutrición (347).

Es posible que estas sean las razones por las que las interacciones helminto-sistema hemostático identificadas en la presente Tesis Doctoral se hayan relacionado, principalmente, con mecanismos de supervivencia parasitaria, nutrición, invasión y migración por los tejidos del hospedador y evasión de sus respuestas de defensa, así como con la aparición de procesos patológicos en el hospedador. Sin embargo, el significado fisiológico de estas interacciones en las helmintiasis no se ha llegado a demostrar totalmente, pues solo el 2 % de los trabajos incluidos en la revisión llevaron a cabo experimentos de validación funcional para determinar si la interacción estaba, en efecto, implicada en los procesos biológicos atribuidos. El estudio de la significación biológica de estos mecanismos podría proporcionar información muy valiosa que contribuiría a aumentar el conocimiento científico sobre el papel real de las interacciones que se producen entre los parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores, como ha ocurrido en el caso del nematodo *D. immitis* (323,348,349) y algunos protozoos parásitos (350,351).

Las interacciones con el sistema hemostático del hospedador se describieron en vermes adultos, huevos y distintos estadios larvarios de los helmintos. Estos resultados indican que estos parásitos podrían manipular este sistema del hospedador durante la totalidad de su ciclo biológico en el vertebrado, como se puede observar en *S. mansoni* (ver Anexo V). Para algunos protozoos parásitos, como *Trypanosoma* spp. y *Plasmodium* spp., esta interacción parásito-sistema hemostático también se ha demostrado en los estadios que se desarrollan en el invertebrado que actúa como vector. Estas fases evolutivas son capaces de utilizar proteínas de la sangre tomada del vertebrado por el vector para favorecer la invasión de los tejidos de este último y/o su transmisión al siguiente hospedador vertebrado (351-354). Está por determinar si esto podría suceder en

el contexto de los helmintos parásitos transmitidos por vectores. Por otra parte, el hecho de que la mayor parte de las interacciones hayan sido identificadas en vermes adultos indica que este es el estadio empleado de manera preferente como material parasitario para estudiar la interacción entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático. Como ya se ha planteado, una mayor utilización de las fases larvarias, preferiblemente de aquellas más tempranas en la infección del hospedador definitivo, podría contribuir a aumentar el conocimiento sobre el funcionamiento y la implicación de este tipo de interacciones en el inicio de la infección, momento clave para el establecimiento del parásito en el hospedador (355).

Según los resultados obtenidos en la revisión de alcance recogida en la presente Tesis Doctoral, se emplearon una amplia variedad de metodologías para estudiar las interacciones entre los helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores, siendo las más utilizadas las técnicas de ELISA, electroforesis SDS-PAGE, inmunoblot, análisis del tiempo de coagulación y cromogénicas. Otras técnicas apenas identificadas en la revisión y empleadas de forma rutinaria en la práctica clínica, como la tromboelastografía, podrían proporcionar un enfoque diferente al estudio de este tipo de interacciones, pues permiten analizar simultáneamente diferentes parámetros de la hemostasia (356). De igual manera, el uso de metodologías más novedosas para identificar las moléculas responsables de la interacción, como las técnicas «-ómicas», escasamente registradas en esta revisión, podrían ser útiles para lograr una mayor comprensión de las relaciones parásito-hospedador y encontrar nuevas dianas terapéuticas más efectivas (11,319,320). De hecho, algunas de las proteínas parasitarias recogidas en la revisión (principalmente serpinas y receptores del plasminógeno) han sido propuestas como potenciales dianas para vacunación y tratamientos antihelmínticos (322,329). El estudio más profundo de estas moléculas y sus implicaciones podría conducir al desarrollo, no solo de antiparasitarios, sino también de nuevas terapias para el tratamiento de patologías inducidas por la plasmina y/o trastornos hemorrágicos en humanos, los cuales son responsables de una de cada cuatro muertes en el mundo (357). Respecto a estos últimos, la proteína anticoagulante c2 del nematodo *A. caninum* (NAPc2) (ver Anexo V) ha sido evaluada como agente antitrombótico en ensayos clínicos de fase II con resultados prometedores, demostrando ser una estrategia segura, bien tolerada y efectiva para reducir la formación de trombos en enfermedades coronarias, durante intervenciones quirúrgicas o en postoperatorios (358-360). Recientemente, esta

molécula también ha sido propuesta como candidato para su evaluación en pacientes hospitalizados con COVID-19 con un riesgo elevado de trombosis (361).

Finalmente, el elevado número de interacciones identificadas en algunas especies de helmintos, como *A. caninum*, *S. mansoni* y *D. immitis*, podría tener un significado biológico o simplemente deberse a factores subjetivos, entre los que se incluyen su uso como modelos parasitarios o el interés científico que han suscitado en algunos grupos de investigación debido al contacto directo que estas especies tienen con el sistema cardiovascular del hospedador. Algo similar podría ocurrir con la aparente asociación de determinadas especies de helmintos con la mayor modulación de una de las dos vías del sistema hemostático (p. ej. *Ancylostoma* spp.-sistema de la coagulación, *D. immitis*-sistema fibrinolítico), así como con el mayor número de interacciones registradas para algunas de las proteínas identificadas como responsables de la interacción, tanto del parásito (p. ej. proteínas o péptidos anticoagulantes de *Ancylostoma* spp., enolasa) como del hospedador (p. ej. FXa, plasminógeno). Asimismo, el conocimiento existente sobre la fisiología y fisiopatología del sistema hemostático y la biología de los helmintos parásitos, o los avances en investigación en campos de estudio próximos, como el de la microbiología, podrían condicionar los efectos y/o procesos biológicos que se le atribuyen a la interacción parásito-sistema hemostático cuando no existe una validación empírica.

Entre las especies de helmintos identificadas en la revisión de alcance por interactuar con el sistema hemostático de su hospedador se encontraba *A. suum*. El estudio que describía dicha interacción revelaba la capacidad de los vermes adultos del parásito para prolongar el APTT y provocar deficiencias en la agregación de plaquetas (362). No obstante, no se registró ningún trabajo que empleara como material parasitario su larva de tercer estadio. Esta fase evolutiva realiza una extensa y compleja ruta migratoria a través de la circulación sanguínea de su hospedador, desde que accede a ella en el intestino hasta que la abandona en los pulmones para retornar al tubo digestivo, donde alcanza el estadio adulto y se establece de forma definitiva (55). Este tipo de migraciones parasitarias que empiezan y terminan en el mismo punto resultan especialmente paradójicas, puesto que conllevan un elevado coste adaptativo para el parásito en términos bioquímicos y morfológicos, además de entrañar serios riesgos para su supervivencia. Es por esto por lo que este mecanismo se ha propuesto como una estrategia evolutiva ventajosa que proporcionaría al parásito beneficios relacionados con su crecimiento, fecundidad o establecimiento en el hospedador (80). Pese a la importancia

que la migración de esta larva tendría para el desarrollo de *A. suum* y su establecimiento en el hospedador, los mecanismos moleculares que rigen dicho proceso no son bien conocidos (86,98). Como se ha mencionado anteriormente, desentrañar las interacciones moleculares que ocurren en el primer contacto que se produce entre parásito y hospedador, representado en *A. suum* por la larva de tercer estadio, es un factor clave en el avance hacia el desarrollo de herramientas de control que resulten efectivas contra el parásito (86,97,105). En el caso de *A. suum*, el desarrollo de estas herramientas es especialmente necesario, pues no existen métodos diagnósticos óptimos y su tratamiento y prevención actuales están basados en el uso de fármacos antihelmínticos (82). Con la finalidad de contribuir al estudio de las relaciones parásito-hospedador en la ascariosis porcina, principalmente durante las primeras etapas de la infección, se planteó el segundo objetivo de la Tesis Doctoral y se realizó un estudio experimental sobre la interacción molecular entre la larva de tercer estadio de *A. suum* (L3As) y el sistema hemostático de su hospedador. Dado que la mayor parte de las moléculas parasitarias implicadas en este tipo de interacciones se encuentran en la interfase parásito-hospedador, se emplearon extractos de la superficie (L3AsS) y de los productos excretores/secretorios (L3AsES) de las L3As para llevar a cabo los experimentos, previa obtención de dichas larvas tras la extracción e incubación de huevos del parásito.

Los resultados del estudio de la interacción entre las L3As y el sistema de la coagulación revelaron que los extractos L3AsS y L3AsES inhiben factores de la cascada de la coagulación de las vías extrínseca, intrínseca y/o común previos a la transformación del fibrinógeno en fibrina. Esto es debido a que los ensayos para el PT y el APTT estuvieron significativamente alterados en presencia de ambos extractos parasitarios, pero no se observaron diferencias significativas en el ensayo para el TT. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en estudios que emplearon metodologías similares en otros helmintos parásitos (363-365) y refuerzan los experimentos desarrollados con vermes adultos de *A. suum* y larvas de *A. lumbricoides* durante los años 80 y 90 (362,366). En la revisión de alcance incluida en la presente Tesis Doctoral, la capacidad para prolongar los tiempos de coagulación «PT» y «APTT» se identificó en diez y doce especies de helmintos parásitos, respectivamente, mientras que la prolongación del TT solamente se describió en tres especies. Como se puede observar en dicha revisión, este efecto anticoagulante se debería, principalmente, a la inhibición que ejercen los parásitos sobre los factores de la coagulación de sus hospedadores. Esta capacidad se describió en

nueve especies de helmintos y los factores inhibidos fueron el complejo TF-FVIIa, el FXIIa, el FXIa, el FXa, el complejo FXa-FVa y la trombina, siendo el FXa la molécula inhibida en un mayor número de casos. En el estudio experimental llevado a cabo con los extractos complejos de las L3As se reveló que tanto L3AsS como L3AsES tienen actividad inhibitoria sobre el FXa. El papel central que este factor juega en la cascada de la coagulación ha hecho que se haya descrito como una molécula crucial en la hemostasia y se haya propuesto como una diana prometedora para el desarrollo de nuevos agentes anticoagulantes (367). De hecho, la proteína anticoagulante de *A. caninum* NAPc2, previamente mencionada en esta discusión por su posible uso en terapia anticoagulante en humanos, es inhibidora, entre otros factores, del FXa (ver Anexo V). Dentro de los organismos parasitarios, la capacidad para inhibir la cascada de la coagulación del hospedador no está restringida a los helmintos, ya que se han obtenido resultados similares en diversos grupos de artrópodos, como mosquitos, moscas, chinches o garrapatas, tanto para la prolongación de los tiempos de coagulación (368-371) como para la inhibición de los factores que la constituyen (368,372-376).

Puesto que la antitrombina III, que es el principal inhibidor de la coagulación sanguínea en vertebrados (249), es una serpina (239), las serpinas de los parásitos han sido las moléculas sugeridas como responsables de inhibir los factores de la coagulación del hospedador (322,375,377-379). En efecto, la revisión de alcance mostró que, de las interacciones en las que se produjo la inhibición de algún factor de la coagulación y se identificó la molécula parasitaria responsable del proceso, esta fue una proteína con actividad serpina en el 96 % de los casos. Por ello, el estudio experimental sobre las L3As recogido en la presente Tesis Doctoral se centró en la búsqueda de serpinas como potenciales inhibidores del FXa, para lo cual se empleó una electroforesis SDS-PAGE debido a que el mecanismo de inhibición de las serpinas implica la formación de un complejo irreversible entre ellas y sus proteínas diana (261). Los resultados obtenidos revelaron la formación de posibles complejos de inhibición entre proteínas de los extractos parasitarios (L3AsS y L3AsES) y el FXa, lo cual se correlaciona con estudios similares llevados a cabo en otros nematodos y artrópodos parásitos (365,373,375). El posterior análisis por espectrometría de masas de estos complejos permitió identificar tres serpinas de *A. suum* como posibles candidatos a inhibir el FXa. El alineamiento de secuencia múltiple que comparó estas serpinas con la antitrombina III de cerdos y humanos mostró una relativa homología entre ellas. Sin embargo, la similitud aumentó

notablemente cuando únicamente se compararon los dominios firma de las serpinas. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en otros nematodos (365) y con lo descrito por Zang y Maizels (322), que señalaron que, aunque las serpinas de nematodos y mamíferos tienen baja homología, están altamente conservadas en la mayoría de los residuos de aminoácidos que son necesarios para mantener la estructura y función de las proteínas, como el dominio firma en el caso de las serpinas. Por tanto, *A. suum* en particular y los helmintos parásitos en general podrían expresar moléculas similares a las responsables de inhibir la cascada de la coagulación en sus hospedadores vertebrados, lo que sugiere convergencia evolutiva entre las serpinas de ambos organismos.

Los resultados del estudio de la interacción entre las L3As y el sistema fibrinolítico mostraron que L3AsS y L3AsES unen plasminógeno, característica hallada en otras doce especies de helmintos parásitos, según la revisión de alcance, y en numerosos protozoos parásitos y bacterias y hongos patógenos (325). En algunos de estos parásitos, además, dicha unión se localizó en su superficie mediante técnicas de inmunofluorescencia (312,380,381), al igual que también se pudo observar en las L3As. Los análisis por espectrometría de masas permitieron identificar doce proteínas presentes en los extractos L3AsS y L3AsES como potenciales receptores del plasminógeno. En cinco casos (actina, disulfuro isomerasa, fructosa-bisfosfato aldolasa, GAPDH y lectina de unión a beta-galactósido), su potencial para interactuar con el plasminógeno se había descrito previamente en otras especies de helmintos parásitos, como queda reflejado en la revisión de alcance. La GAPDH fue la proteína que se identificó en un mayor número de especies (cinco especies), seguida de la actina y la fructosa-bisfosfato aldolasa, las cuales se identificaron en tres especies. La disulfuro isomerasa y la lectina de unión a beta-galactósido solamente se identificaron en una especie cada una (*F. hepatica* y *D. immitis*, respectivamente). La fructosa-bisfosfato aldolasa y la GAPDH también se han descrito como proteínas receptoras del plasminógeno en bacterias y hongos patógenos, y la última, además, en protozoos parásitos (325). El resto de proteínas identificadas como fijadoras del plasminógeno en las L3As se han relacionado con el reclutamiento de esta enzima por primera vez en este trabajo, a excepción de la subunidad ATP sintasa, ya que diferentes subunidades de esta proteína unen angiostatina, un fragmento proteolítico del plasminógeno, en células humanas (382). Conforme a los resultados obtenidos, se observó además que la unión del plasminógeno requería la participación de los residuos de lisina de las proteínas parasitarias responsables de la interacción, los cuales

interaccionarían, a su vez, con los dominios *kringle* del plasminógeno (332). Este mecanismo es compartido con los receptores del plasminógeno tanto de otros parásitos (310,312,383-386) como de los hospedadores vertebrados (329). Como se puede observar en los modelos 3D desarrollados en la presente Tesis Doctoral y en estudios similares llevados a cabo con otros nematodos (348,349,386), los residuos de lisina se localizan en la parte externa de las proteínas, lo que podría facilitar la accesibilidad al plasminógeno del hospedador.

Además de unir plasminógeno, L3AsS y L3AsES activan dicho plasminógeno y potencian la generación de plasmina en presencia de los dos principales activadores del plasminógeno del hospedador: el tPA y el uPA. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en la revisión de alcance, pues en ella se identificaron nueve especies de helmintos parásitos con esta misma capacidad, siete de las cuales activaron el plasminógeno por medio del tPA y dos en presencia del uPA. En protozoos y artrópodos parásitos también se ha descrito este mecanismo de activación del sistema fibrinolítico del hospedador (351,387-390). En el estudio experimental con las L3As que forma parte de la presente Tesis Doctoral, la generación de plasmina por el tPA fue más efectiva en presencia de L3AsS, lo cual podría deberse al papel que esta molécula tiene como principal activador del plasminógeno en la degradación de fibrina a nivel vascular (273). Las L3As podrían utilizar las proteínas fijadoras del plasminógeno asociadas a su superficie para promover la generación de plasmina en su hábitat inmediato durante su migración a través del torrente sanguíneo. Por el contrario, la generación de plasmina por el uPA fue mayor en presencia de L3AsES. El uPA, al unirse a su receptor celular (el uPAR) activa el plasminógeno unido a él y produce proteólisis pericelular (273). Como consecuencia, las L3As podrían utilizar las proteínas fijadoras del plasminógeno presentes en sus productos excretorios/secretorios para impulsar la generación de plasmina en sitios celulares específicos a nivel sistémico, como se ha propuesto para otros patógenos (383-391). Por último, los resultados obtenidos también revelaron que L3AsS induce la generación de plasmina por sí mismo, en ausencia de los activadores del plasminógeno. Todos los estudios considerados en la revisión de alcance revelaron la dependencia de los activadores fisiológicos del plasminógeno (tPA o uPA) para promover la generación de plasmina, a excepción de un ensayo llevado a cabo con extractos complejos del tegumento de vermes adultos de *S. bovis* (312). Estos hallazgos podrían

indicar la presencia de activadores del plasminógeno en la superficie de los parásitos, como ya se ha descrito para diferentes géneros de bacterias (392,393).

Todos estos resultados sugieren que las L3As tienen capacidad para modular el sistema hemostático de su hospedador, evitando la formación de coágulos sanguíneos y promoviendo su disolución. Las L3As podrían beneficiarse del correspondiente potencial anticoagulante y profibrinolítico, no solo en su hábitat inmediato, sino también al dirigirlo hacia aquellos lugares donde su actividad es requerida a nivel pericelular. Esto es debido a que, como muestran los resultados de la presente Tesis Doctoral, las L3As expresan proteínas con capacidad para modular el sistema hemostático, tanto en su superficie como formando parte de los componentes excretados y/o secretados a su entorno, lo que sugiere una acción combinada entre las proteínas de ambos compartimentos en la interfase parásito-hospedador. La aparición de coágulos sanguíneos en el hospedador podría constituir una barrera física para la migración de las L3As a través de la circulación sanguínea y los tejidos de su hospedador (323). La manipulación del sistema hemostático por parte de estas larvas podría, por una parte, limitar la generación de fibrina, reduciendo así la formación de coágulos sanguíneos, y por otra, degradar la red de fibrina de dichos coágulos, favoreciendo su disolución. Pero la diversidad de procesos en los que participan los componentes del sistema hemostático podría hacer que la modulación de este sistema del hospedador por parte de las L3As no estuviera implicada, únicamente, en evitar la formación de trombos.

Aparte de la fibrina de los coágulos sanguíneos, la matriz extracelular también constituye una barrera para la migración de los parásitos por los tejidos de su hospedador (323). Así, las enzimas proteolíticas, propias del parásito o adquiridas del hospedador, con capacidad para degradar los componentes de dichas matrices juegan un papel esencial en la invasión, la migración y el consecuente establecimiento del parásito en el hospedador (98). Dado que la plasmina interviene en la degradación de la matriz extracelular (276), la generación de esta proteasa tras la activación del sistema fibrinolítico del hospedador por parte del parásito podría ser una de esas enzimas adquiridas y favorecer la invasión y migración de las L3As por los tejidos de su hospedador, al igual que se ha descrito para diferentes géneros de bacterias (342,344,393). Otro resultado que se ha atribuido a la degradación de los componentes de la matriz extracelular es la alimentación de las L3As, por lo que la plasmina también podría participar en dicha función (98). El efecto proteolítico de esta enzima adquirida

complementaría el repertorio de proteasas del parásito en una estrategia que estaría directamente relacionada con el ahorro energético y la evasión de la respuesta inmune del hospedador (329).

La plasmina también tiene capacidad para degradar inmunoglobulinas y componentes del sistema del complemento (338-341) y el sistema de la coagulación interviene en la respuesta inmune durante las infecciones (337). Es por ello por lo que la activación del plasminógeno y la inhibición de la cascada de la coagulación por parte de las L3As podrían constituir mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedador. Estos mecanismos podrían facilitar, al menos en parte, que las L3As alcancen su localización definitiva en el intestino delgado sin ser eliminadas por procesos inmunitarios durante su migración a través de la circulación sanguínea. Además, se ha propuesto que complejos formados entre serpinas de *A. suum* y proteasas del hospedador podrían enmascarar la superficie de las larvas, evadiendo así la respuesta inmune del hospedador durante su migración (394). Todavía está por determinar si las serpinas identificadas en la superficie de las L3As en la presente Tesis Doctoral podrían desempeñar esta función. Investigaciones futuras también podrían establecer si dichas serpinas participarían en la protección de *A. suum* frente a su degradación por las enzimas proteolíticas digestivas del hospedador, como se ha atribuido a otras serpinas de este parásito (394). La homología hallada entre serpinas de helmintos y vertebrados sugiere que estas enzimas podrían haber sido expresadas por los parásitos como una estrategia para interferir en los procesos dependientes de proteasas de serina de los vertebrados, como la coagulación, la activación del sistema del complemento o la inflamación, todos ellos mecanismos implicados en la defensa del parásito frente al hospedador (322). A pesar del papel significativo de las serpinas en la supervivencia de los helmintos, se ha sugerido que serpinas liberadas por los parásitos podrían ser detectadas por el sistema inmune del hospedador debido a su elevado potencial inmunógeno, de manera que se han propuesto como dianas para el desarrollo de vacunas (322,377).

En definitiva, la modulación del sistema hemostático del hospedador por parte de las L3As mediante la inhibición de la cascada de la coagulación y la activación del sistema fibrinolítico podría favorecer su migración y, por tanto, el establecimiento del parásito en el hospedador, constituyendo un mecanismo de supervivencia para *A. suum*. Sin embargo, la interferencia de las L3As con este sistema fisiológico podría tener también un impacto negativo sobre el hospedador. La sobreproducción de plasmina desencadenada por el

parásito *D. immitis* en su hospedador se ha relacionado con la aparición de procesos patológicos de proliferación y migración celular a nivel vascular (323,348). Curiosamente, una de las lesiones más distintivas de la ascariosis porcina es la aparición de «manchas de leche» en el hígado y los pulmones. Estas lesiones constituyen focos fibróticos, necróticos y hemorrágicos que están acompañados de trayectorias migratorias de las larvas de características similares (86,89,90). Aunque está descrito que estas lesiones se producirían como resultado de la acción mecánica de las larvas y de la respuesta inflamatoria que induce su migración (86), la sobreproducción de plasmina causada por el parásito también podría contribuir a agravar este fenómeno inflamatorio. Por otra parte, la inhibición de la coagulación sanguínea y/o la activación del sistema fibrinolítico podrían estar relacionadas, al menos en parte, con las lesiones hemorrágicas que aparecen en el hígado y los pulmones y los sangrados petequiales que surgen en la mucosa intestinal en aquellas zonas del ciego y del colon proximal por las que las larvas penetran a la circulación sanguínea del hospedador (86).

Finalmente, el estudio experimental desarrollado en la presente Tesis Doctoral pone de manifiesto, por primera vez y de manera conjunta, la interacción molecular entre la larva de tercer estadio de *A. suum* y el sistema hemostático de su hospedador. Los resultados obtenidos establecen una base científica que podría ser útil para desentrañar en el futuro parte de las relaciones parásito-hospedador que tienen lugar, no solo en la ascariosis porcina, sino también en la ascariosis humana. Esto se debe a que *A. suum* es considerado un modelo conveniente para estudiar *A. lumbricoides*, pues ambas especies tienen ciclos biológicos idénticos (55) y cada vez son más numerosos los estudios que sugieren flujo génico, hibridación y transmisión cruzada entre ellas (28,29,226,227). Al igual que ocurre en la ascariosis porcina, los mecanismos moleculares que rigen la variante humana tampoco son completamente conocidos (86,98). Investigaciones futuras dirigidas a estudiar en profundidad las moléculas parasitarias identificadas en este trabajo y la importancia biológica para parásito y hospedador de las interacciones descritas, podrían ser de vital importancia para diseñar nuevas herramientas que permitan el control de estas parasitosis antes de que los vermes adultos se establezcan en su localización definitiva. Por otra parte, la identificación y caracterización de dichas moléculas podría permitir la selección de candidatos potenciales para desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de desórdenes hemostáticos en humanos, al igual que ocurre con proteínas de características similares procedentes de otros parásitos.

CONCLUSIONES

1. Se pone de manifiesto la importancia de la explotación del sistema hemostático del hospedador vertebrado para los helmintos parásitos a través del considerable número de especies de este grupo que han adoptado esta estrategia en diferentes estadios evolutivos. Dicha interacción tiene como resultado, generalmente, la inhibición de la coagulación y la activación de la fibrinólisis.
2. El conjunto de proteínas parasitarias que interacciona con un elevado número de componentes hemostáticos del hospedador, así como su homología con los moduladores fisiológicos de esta ruta, refleja la redundancia de este mecanismo parasitario.
3. Existe un patrón común de interacción entre las diferentes especies de helmintos parásitos y el sistema hemostático de sus hospedadores, lo que sugiere procesos de convergencia evolutiva. Estos procesos podrían haberse conservado al ser beneficiosos en términos de nutrición, establecimiento y supervivencia para los helmintos parásitos dentro del organismo vertebrado.
4. Pese a existir un interés creciente en el estudio de las interacciones helminto-sistema hemostático, se detectan vacíos de conocimiento en referencia, principalmente, al estudio de la significación biológica de estos mecanismos que sería interesante, necesario e importante suplir.
5. La larva de tercer estadio de *Ascaris suum* interacciona con el sistema hemostático de su hospedador, inhibiendo la coagulación y activando el sistema fibrinolítico mediante la acción conjunta de sus extractos de superficie y excretor/secretor. Dicha interacción está mediada por la inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y común y, de al menos, el factor Xa en el sistema de la coagulación, así como por la unión del plasminógeno y la potenciación de la generación de plasmina en el caso de la ruta fibrinolítica.
6. Se proponen tres serpinas con capacidad para inhibir el factor Xa y doce proteínas fijadoras de plasminógeno de la larva de tercer estadio de *A. suum* en la interfase parásito-hospedador como potenciales moléculas parasitarias con capacidad anticoagulante y profibrinolítica, respectivamente.

7. La manipulación de la hemostasia del hospedador podría ser utilizada por la larva de tercer estadio de *A. suum* para desplazar el equilibrio hemostático hacia un estado antitrombótico en su hábitat intravascular, lo que supondría un mecanismo de supervivencia que facilitaría su capacidad para migrar y, por tanto, su establecimiento en el hospedador. Por ello, y debido al alto grado de conservación evolutiva de algunas de las moléculas identificadas y caracterizadas en la presente Tesis Doctoral, el estudio profundo de estos procesos podría desembocar en el diseño más racional de nuevas herramientas de control, no solo en la ascariosis porcina, sino en otras enfermedades causadas por helmintos parásitos.

BIBLIografía

1. Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. Helminth parasites – masters of regulation. *Immunol Rev.* 2004;201:89-116.
2. Poulin R. *Evolutionary Ecology of Parasites.* 2^a ed. Princeton: Princeton University Press; 2007.
3. Poulin R, Maure F. Host Manipulation by Parasites: A Look Back Before Moving Forward. *Trends Parasitol.* 2015;31(11):563-70.
4. Mehlhorn H. *Encyclopedia of Parasitology.* 4^a ed. Berlin: Springer; 2016.
5. Hewitson JP, Maizels RM. Vaccination against helminth parasite infections. *Expert Rev Vaccines.* 2014;13(4):473-87.
6. World Health Organization [Internet]. [Consultado en 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/>.
7. Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1311-21.
8. Viney ME, Graham AL. Patterns and Processes in Parasite Co-Infection. *Adv Parasitol.* 2013;82:321-69.
9. Salgame P, Yap GS, Gause WC. Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens. *Nat Immunol.* 2013;14(11):1118-26.
10. Maizels RM, McSorley HJ. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(3):666-75.
11. Robinson MW, Cwiklinski K. Proteomics of Host-Helminth Interactions. *Pathogens.* 2021;10(10):1317.
12. Otranto D, Cantacessi C, Dantas-Torres F, Brianti E, Pfeffer M, Genchi C, *et al.* The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part II: Helminths and arthropods. *Vet Parasitol.* 2015;213(1-2):24-37.
13. Thompson RCA, Kutz SJ, Smith A. Parasite Zoonoses and Wildlife: Emerging Issues. *Int J Environ Res Public Health.* 2009;6(2):678-93.
14. Fissiha W, Kinde MZ. Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. *Infect Drug Resist.* 2021;14:5403-10.
15. Perera DJ, Ndao M. Promising Technologies in the Field of Helminth Vaccines. *Front Immunol.* 2021;12:711650.
16. Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.* 2004;20(10):469-76.
17. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol.* 2006;136(3-4):167-85.
18. Cabada MM, Lopez M, Cruz M, Delgado JR, Hill V, White AC Jr. Treatment Failure after Multiple Courses of Triclabendazole among Patients with Fascioliasis in Cusco, Peru: A Case Series. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004361.
19. Ahuir-Baraja AE, Cibot F, Llobat L, Garijo MM. Anthelmintic resistance: is a solution possible? *Exp Parasitol.* 2021;230:108169.
20. Furtado LFV, Medeiros CDS, Zuccherato LW, Alves WP, de Oliveira VNGM, da Silva VJ, *et al.* First identification of the benzimidazole resistance-associated F200Y SNP in the beta-tubulin gene in *Ascaris lumbricoides*. *PLoS One.* 2019;14(10):e0224108.

21. Simón F, González-Miguel J, Diosdado A, Gómez PJ, Morchón R, Kartashev V. The Complexity of Zoonotic Filariasis Epistystem and Its Consequences: A Multidisciplinary View. *Biomed Res Int.* 2017;2017:6436130.
22. Booth M. Climate Change and the Neglected Tropical Diseases. *Adv Parasitol.* 2018;100:39-126.
23. Rahman MT, Sobur MA, Islam MS, Ievy S, Hossain MJ, El Zowalaty ME, *et al.* Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms.* 2020;8(9):1405.
24. Claerebout E, Geldhof P. Helminth Vaccines in Ruminants: From Development to Application. *Vet Clin North Am Food Anim.* 2020;36(1):159-71.
25. Zawawi A, Else KJ. Soil-Transmitted Helminth Vaccines: Are We Getting Closer? *Front Immunol.* 2020;11:576748.
26. Leles D, Gardner SL, Reinhard K, Iñiguez A, Araujo A. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? *Parasit Vectors.* 2012;5:42.
27. Nejsum P, Hawash MBF, Betson M, Stothard JR, Gasser RB, Andersen LO. *Ascaris* phylogeny based on multiple whole mtDNA genomes. *Infect Genet Evol.* 2017;48:4-9.
28. Criscione CD, Anderson JD, Sudimack D, Peng W, Jha B, Williams-Blangero S, *et al.* Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs. *Proc Biol Sci.* 2007;274(1626):2669-77.
29. Betson M, Nejsum P, Bendall RP, Deb RM, Stothard JR. Molecular Epidemiology of Ascariasis: A Global Perspective on the Transmission Dynamics of *Ascaris* in People and Pigs. *J Infect Dis.* 2014;210(6):932-41.
30. Gonçalves MLC, Araújo A, Ferreira LF. Human Intestinal Parasites in the Past: New Findings and a Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(1):103-18.
31. Loreille O, Bouchet F. Evolution of Ascariasis in Humans and Pigs: a Multi-disciplinary Approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(1):39-46.
32. Patrucco R, Tello R, Bonavia D. Parasitological Studies of Coprolites of Pre-Hispanic Peruvian Populations. *Curr Anthropol.* 1983;24(3):393-4.
33. Cox FEG. History of Human Parasitology. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):595-612.
34. Apt W. Generalidades. En: Apt W, editor. *Parasitología humana.* 1ª ed. México D.F.: McGraw-Hill; 2013. p. 3-5.
35. Zhou C, Chen J, Niu H, Ouyang S, Wu X. Study on the population evolution of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* based on whole genome resequencing. *Vet Parasitol.* 2020;279:109062.
36. Mote DC. *Ascaris suum* in sheep. *Science.* 1914;40(1023):216.
37. Vassilev I. The goat (*Capra hircus*) as host of *Ascaris suum* Goeze, 1782. *C R Acad Bulg Sci.* 1960;13:75-8.
38. Ronéus O, Christensson D. Mature *Ascaris suum* in naturally infected calves. *Vet Parasitol.* 1977; 3:371-5.
39. Nejsum P, Grøndahl C, Murrell KD. Molecular evidence for the infection of zoo chimpanzees by pig *Ascaris*. *Vet Parasitol.* 2006;139(1-3):203-10.
40. Taylor HL, Spagnoli ST, Calcutt MJ, Kim DY. Aberrant *Ascaris suum* Nematode Infection in Cattle, Missouri, USA. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(2):339-40.

41. Xie Y, Liu Y, Gu X, Zhou X, Peng X, He R, *et al.* First report on aberrant *Ascaris suum* infection in a dog, China. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):86.
42. Anderson TJC. *Ascaris* infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. *Parasitology*. 1995;110(2):215-9.
43. Nejsum P, Parker ED Jr, Frydenberg J, Roepstorff A, Boes J, Haque R, *et al.* Ascariasis Is a Zoonosis in Denmark. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1142-8.
44. Arizono N, Yoshimura Y, Tohzaka N, Yamada M, Tegoshi T, Onishi K, *et al.* Ascariasis in Japan: Is Pig-Derived *Ascaris* Infecting Humans? *Jpn J Infect Dis*. 2010;63(6):447-8.
45. Bendall RP, Barlow M, Betson M, Stothard JR, Nejsum P. Zoonotic Ascariasis, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1964-6.
46. Simón-Vicente F, Simón-Martín F. Nematodos. En: Cordero-del Campillo M, Rojo-Vázquez FA, coordinadores. *Parasitología veterinaria*. 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill; 1999. p. 113-23.
47. Geenen PL, Bresciani J, Boes J, Pedersen A, Eriksen L, Fagerholm HP, *et al.* The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third-stage larvae within the egg. *J Parasitol*. 1999;85(4):616-22.
48. Fagerholm HP, Nansen P, Roepstorff A, Frandsen F, Eriksen L. Differentiation of cuticular structures during the growth of the third-stage larva of *Ascaris suum* (Nematoda, Ascaridoidea) after emerging from the egg. *J Parasitol*. 2000;86(3):421-7.
49. Maung M. The occurrence of the second moult of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. *Int J Parasitol*. 1978;8(5):371-8.
50. Jenkins DC. Observations on the early migration of the larvae of *Ascaris suum* Goeze, 1782 in white mice. *Parasitology*. 1968;58(2):431-40.
51. Murrell KD, Eriksen L, Nansen P, Slotved HC, Rasmussen T. *Ascaris suum*: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. *J Parasitol*. 1997;83(2):255-60.
52. Slotved HC, Eriksen L, Murrell KD, Nansen P. Early *Ascaris suum* migration in mice as a model for pigs. *J Parasitol*. 1998;84(1):16-8.
53. Roepstorff A, Eriksen L, Slotved HC, Nansen P. Experimental *Ascaris suum* infection in the pig: worm population kinetics following single inoculations with three doses of infective eggs. *Parasitology*. 1997;115(4):443-52.
54. Pilitt PA, Lichtenfels JR, Tromba FG, Madden PA. Differentiation of Late Fourth and Early Fifth Stages of *Ascaris suum* Goeze, 1782 (Nematoda: Ascaridoidea) in Swine. *Proc Helminthol Soc Wash*. 1981;48(1):1-7.
55. Dold C, Holland CV. *Ascaris* and ascariasis. *Microbes Infect*. 2011;13(7):632-7.
56. Olsen LS, Kelley GW, Sen HG. Longevity and Egg-Production of *Ascaris suum*. *Trans Am Microsc Soc*. 1958;77(4):380-3.
57. Andersen S, Jørgensen RJ, Nansen P, Nielsen K. Experimental *Ascaris suum* infection in piglets. Inverse relationship between the numbers of inoculated eggs and the numbers of worms established in the intestine. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*. 1973;81(6):650-6.
58. Kelley GW Jr, Smith LJ. The daily egg production of *Ascaris suum* and the inability of low levels of aureomycin to affect egg production and embryonation. *J Parasitol*. 1956;42(6):587.
59. Sinniah B. Daily egg production of *Ascaris lumbricoides*: the distribution of eggs in the faeces and the variability of egg counts. *Parasitology*. 1982;84(1):167-75.

60. Cordero-del Campillo M, Hidalgo-Argüello MR, Díez-Baños N, Rojo-Vázquez FA, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM. Parasitosis del aparato digestivo. En: Cordero-del Campillo M, Rojo-Vázquez FA, coordinadores. Parasitología veterinaria. 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill; 1999. p. 451-82.
61. Thompson DP, Geary TG. Helminth surfaces: Structural, molecular and functional properties. En: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW, editores. Molecular Medical Parasitology. 1ª ed. San Diego: Academic Press; 2003. p. 297-338.
62. García-Más I, Muñoz-Araújo B, Aguirre-Inchaurre A, Polo-Roldán I, García-Moreno A, Refoyo-Román P. Manual de laboratorio de Parasitología. 10. Nematodos. Reduca (Biología). Serie Parasitología. 2009;2(5):37-63.
63. Apt W. Ascariasis. En: Apt W, editor. Parasitología humana. 1ª ed. México D.F.: McGraw-Hill; 2013. p. 214-20.
64. Beames CG Jr, Bailey HH, Schanbacher LM, Rock CO. Movement of triglycerides and monoglycerides across the intestine of *Ascaris suum*. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol. 1974;47(3):889-96.
65. Fleming MW, Fetterer RH. *Ascaris suum*: Continuous Perfusion of the Pseudocoelom and Nutrient Absorption. Exp Parasitol. 1984;57(2):142-8.
66. Prats G. Microbiología y parasitología médicas. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2013.
67. Fairbairn D. The Biochemistry of *Ascaris*. Exp Parasitol. 1957;6(5):491-554.
68. Depositphotos [Internet]. [Consultado en 2023]. Disponible en: <https://sp.depositphotos.com/vector-images/ascaris.html>.
69. Maya C, Ortiz M, Jiménez B. Viability of *Ascaris* and other helminth genera non larval eggs in different conditions of temperature, lime (pH) and humidity. Water Sci Technol. 2010;62(11):2616-24.
70. Maya C, Torner-Morales FJ, Lucario ES, Hernández E, Jiménez B. Viability of six species of larval and non-larval helminth eggs for different conditions of temperature, pH and dryness. Water Res. 2012;46(15):4770-82.
71. Kim MK, Pyo KH, Hwang YS, Park KH, Hwang IG, Chai JY, *et al.* Effect of Temperature on Embryonation of *Ascaris suum* Eggs in an Environmental Chamber. Korean J Parasitol. 2012;50(3):239-42.
72. Gaasenbeek CPH, Borgsteede FHM. Studies on the survival of *Ascaris suum* eggs under laboratory and simulated field conditions. Vet Parasitol. 1998;75(2-3):227-34.
73. Yu YM, Cho YH, Youn YN, Quan JH, Choi IW, Lee YH. Quantitative Evaluation of Viability- and Apoptosis-Related Genes in *Ascaris suum* Eggs under Different Culture-Temperature Conditions. Korean J Parasitol. 2012;50(3):243-7.
74. Yu YM, Kim JW, Na WS, Youn YN, Choi IW, Lee YH. Effects of Some Pesticides on Development of *Ascaris suum* Eggs. Korean J Parasitol. 2014;52(1):111-5.
75. Oh KS, Kim GT, Ahn KS, Shin SS. Effects of Disinfectants on Larval Development of *Ascaris suum* Eggs. Korean J Parasitol. 2016;54(1):103-7.
76. Anderson RM, May RM. Helminth Infections of Humans: Mathematical Models, Population Dynamics, and Control. Adv Parasitol. 1985;24:1-101.

77. Walker M, Hall A, Basáñez MG. *Ascaris lumbricoides*: New Epidemiological Insights and Mathematical Approaches. En: Holland C, editora. *Ascaris*: the neglected parasite. 1ª ed. Oxford: Academic Press; 2013. p. 155-201.
78. Lehnert JP. New *Ascaris* Laboratory Ovicides. *J Parasitol*. 1972;58(2):364.
79. Pecson BM, Nelson KL. Inactivation of *Ascaris suum* Eggs by Ammonia. *Environ Sci Technol*. 2005;39(20):7909-14.
80. Read AF, Skorping A. The evolution of tissue migration by parasitic nematode larvae. *Parasitology*. 1995;111(3):359-71.
81. Thamsborg SM, Nejsum P, Mejer H. Impact of *Ascaris suum* in Livestock. En: Holland C, editora. *Ascaris*: the neglected parasite. 1ª ed. Oxford: Academic Press; 2013. p. 363-81.
82. Vlaminck J, Geldhof P. Diagnosis and Control of Ascariasis in Pigs. En: Holland C, editora. *Ascaris*: the neglected parasite. 1ª ed. Oxford: Academic Press; 2013. p. 395-425.
83. Stewart TB, Bidner TD, Southern LL, Simmons LA. Efficacy of fenbendazole against migrating *Ascaris suum* larvae in pigs. *Am J Vet Res*. 1984;45(5):984-6.
84. Schwartz B, Alicata JE. *Ascaris* Larvae as a Cause of Liver and Lung Lesions in Swine. *J Parasitol*. 1932;19(1):17-24.
85. Ronéus O. Studies on the aetiology and pathogenesis of white spots in the liver of pigs. *Acta Vet Scand*. 1966;7(16):1-112.
86. Holland CV, Behnke JM, Dold C. Larval Ascariasis: Impact, Significance, and Model Organisms. En: Holland C, editora. *Ascaris*: the neglected parasite. 1ª ed. Oxford: Academic Press; 2013. p. 107-25.
87. Copeman DB, Gaafar SM. Sequential development of hepatic lesions of ascariidosis in colostrum-deprived pigs. *Aust Vet J*. 1972;48(5):263-8.
88. Nakagawa M, Yoshihara S, Suda H, Ikeda K. Pathological studies on white spots of the liver in fattening pigs. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*. 1983;23(4):138-49.
89. Pérez J, García PM, Mozos E, Bautista MJ, Carrasco L. Immunohistochemical Characterization of Hepatic Lesions Associated with Migrating Larvae of *Ascaris suum* in Pigs. *J Comp Pathol*. 2001;124(2-3):200-6.
90. Liljegren CH, Aalbaek B, Nielsen OL, Jensen HE. Some new aspects of the pathology, pathogenesis, and aetiology of disseminated lung lesions in slaughter pigs. *APMIS*. 2003;111(5):531-8.
91. Löffler W. Transient Lung Infiltrations with Blood Eosinophilia. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1956;8(1-2):54-9.
92. Stephenson LS, Pond WG, Nesheim MC, Krook LP, Crompton DWT. *Ascaris suum*: Nutrient Absorption, Growth, and Intestinal Pathology in Young Pigs Experimentally Infected with 15-Day-Old Larvae. *Exp Parasitol*. 1980;49(1):15-25.
93. Martin J, Crompton DWT, Carrera E, Nesheim MC. Mucosal surface lesions in young protein-deficient pigs infected with *Ascaris suum* (Nematoda). *Parasitology*. 1984;88(2):333-40.
94. Ibáñez-Sanchis C, Blasco-Mateu V. Prevalencia de ascariosis en ganado porcino en un matadero de la Comunidad Valenciana. *Nereis*. 2020;12:167-84.
95. Forsum E, Nesheim MC, Crompton DWT. Nutritional aspects of *Ascaris* infection in young protein-deficient pigs. *Parasitology*. 1981;83(3):497-512.

96. Hale OM, Stewart TB, Marti OG. Influence of an experimental infection of *Ascaris suum* on performance of pigs. *J Anim Sci*. 1985;60(1):220-5.
97. Jex AR, Liu S, Li B, Young ND, Hall RS, Li Y, *et al.* *Ascaris suum* draft genome. *Nature*. 2011;479:529-33.
98. Ebner F, Kuhring M, Radonić A, Midha A, Renard BY, Hartmann S. Silent Witness: Dual-Species Transcriptomics Reveals Epithelial Immunological Quiescence to Helminth Larval Encounter and Fostered Larval Development. *Front Immunol*. 2018;9:1868.
99. Masure D, Wang T, Vlaminck J, Claerhoudt S, Chiers K, Van den Broeck W, *et al.* The Intestinal Expulsion of the Roundworm *Ascaris suum* Is Associated with Eosinophils, Intra-Epithelial T Cells and Decreased Intestinal Transit Time. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(12):e2588.
100. Cortés A, Muñoz-Antoli C, Esteban JG, Toledo R. Th2 and Th1 Responses: Clear and Hidden Sides of Immunity Against Intestinal Helminths. *Trends Parasitol*. 2017;33(9):678-93.
101. Dawson HD, Beshah E, Nishi S, Solano-Aguilar G, Morimoto M, Zhao A, *et al.* Localized Multigene Expression Patterns Support an Evolving Th1/Th2-Like Paradigm in Response to Infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. *Infect Immun*. 2005;73(2):1116-28.
102. Miquel N, Roepstorff A, Bailey M, Eriksen L. Host immune reactions and worm kinetics during the expulsion of *Ascaris suum* in pigs. *Parasite Immunol*. 2005;27(3):79-88.
103. Steenhard NR, Kringel H, Roepstorff A, Thamsborg SM, Jungersen G. Parasite-specific IL-4 responses in *Ascaris suum* and *Trichuris suis*-infected pigs evaluated by ELISPOT. *Parasite Immunol*. 2007;29(10):535-8.
104. Kringel H, Thamsborg SM, Petersen HH, Göring HHH, Skallerup P, Nejsum P. Serum antibody responses in pigs trickle-infected with *Ascaris* and *Trichuris*: Heritabilities and associations with parasitological findings. *Vet Parasitol*. 2015;211(3-4):306-11.
105. Masure D, Vlaminck J, Wang T, Chiers K, Van den Broeck W, Vercruyse J, *et al.* A Role for Eosinophils in the Intestinal Immunity against Infective *Ascaris suum* Larvae. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2138.
106. Dawson H, Solano-Aguilar G, Beal M, Beshah E, Vangimalla V, Jones E, *et al.* Localized Th1-, Th2-, T Regulatory Cell-, and Inflammation-Associated Hepatic and Pulmonary Immune Responses in *Ascaris suum*-Infected Swine Are Increased by Retinoic Acid. *Infect Immun*. 2009;77(6):2576-87.
107. Urban JF Jr, Alizadeh H, Romanowski RD. *Ascaris suum*: Development of Intestinal Immunity to Infective Second-Stage Larvae in Swine. *Exp Parasitol*. 1988;66(1):66-77.
108. Eriksen L, Lind P, Nansen P, Roepstorff A, Urban J. Resistance to *Ascaris suum* in parasite naïve and naturally exposed growers, finishers and sows. *Vet Parasitol*. 1992;41(1-2):137-49.
109. Frontera E, Roepstorff A, Serrano FJ, Gázquez A, Reina D, Navarrete I. Presence of immunoglobulins and antigens in serum, lung and small intestine in *Ascaris suum* infected and immunised pigs. *Vet Parasitol*. 2004;119(1):59-71.
110. Taffs LF. The *in vitro* action of immune pig serum on second- and third-stage *Ascaris suum* larvae. *Parasitology*. 1961;51:327-34.
111. Helwigh AB, Nansen P. Establishment of *Ascaris suum* in the Pig: Development of Immunity Following a Single Primary Infection. *Acta Vet Scand*. 1999;40:121-32.

112. Frontera E, Carrón A, Serrano FJ, Roepstorff A, Reina D, Navarrete I. Specific systemic IgG1, IgG2 and IgM responses in pigs immunized with infective eggs or selected antigens of *Ascaris suum*. *Parasitology*. 2003;127(3):291-8.
113. Kelley GW, Nayak DP. Acquired Immunity to Migrating Larvae of *Ascaris suum* Induced in Pigs by Repeated Oral Inoculations of Infective Eggs. *J Parasitol*. 1964;50(4):499-503.
114. Stankiewicz M, Jeska EL, Froe DL. Acquired resistance to migrating larvae of *Ascaris suum* in young pigs by repeated drug-abbreviated infections. *J Parasitol*. 1990;76(3):383-8.
115. Wang T, Van Steendam K, Dhaenens M, Vlaminck J, Deforce D, Jex AR, *et al*. Proteomic Analysis of the Excretory-Secretory Products from Larval Stages of *Ascaris suum* Reveals High Abundance of Glycosyl Hydrolases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10):e2467.
116. Chehayeb JF, Robertson AP, Martin RJ, Geary TG. Proteomic Analysis of Adult *Ascaris suum* Fluid Compartments and Secretory Products. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(6):e2939.
117. Hansen EP, Fromm B, Andersen SD, Marcilla A, Andersen KL, Borup A, *et al*. Exploration of extracellular vesicles from *Ascaris suum* provides evidence of parasite-host cross talk. *J Extracell Vesicles*. 2019;8(1):1578116.
118. Leventhal R, Soulsby E. *Ascaris suum*: Cuticular Binding of the Third Component of Complement by Early Larval Stages. *Exp Parasitol*. 1977;41(2):423-31.
119. Midttun HLE, Acevedo N, Skallerup P, Almeida S, Skovgaard K, Andresen L, *et al*. *Ascaris suum* Infection Downregulates Inflammatory Pathways in the Pig Intestine In Vivo and in Human Dendritic Cells In Vitro. *J Infect Dis*. 2018;217(2):310-9.
120. Soares MFM, Mota I, Macedo MS. Isolation of *Ascaris suum* Components Which Suppress IgE Antibody Responses. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;97(1):37-43.
121. Ferreira AP, Faquim ES, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Immunization with *Ascaris suum* Extract Impairs T Cell Functions in Mice. *Cell Immunol*. 1995;162(2):202-10.
122. Faquim-Mauro EL, Macedo MS. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clin Exp Immunol*. 1998;114(2):245-51.
123. Deehan MR, Goodridge HS, Blair D, Lochnit G, Dennis RD, Geyer R, *et al*. Immunomodulatory properties of *Ascaris suum* glycosphingolipids - phosphorylcholine and non-phosphorylcholine-dependent effects. *Parasite Immunol*. 2002;24(9-10):463-9.
124. Lima C, Perini A, Garcia MLB, Martins MA, Teixeira MM, Macedo MS. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(11):1659-66.
125. Itami DM, Oshiro TM, Araujo CA, Perini A, Martins MA, Macedo MS, *et al*. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(7):873-9.
126. Oshiro TM, Macedo MS, Macedo-Soares MF. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm Res*. 2005;54:17-21.
127. McConchie BW, Norris HH, Bundoc VG, Trivedi S, Boesen A, Urban JF Jr, *et al*. *Ascaris suum*-Derived Products Suppress Mucosal Allergic Inflammation in an Interleukin-10-Independent Manner via Interference with Dendritic Cell Function. *Infect Immun*. 2006;74(12):6632-41.
128. Oshiro TM, Enobe CS, Araújo CA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. *Immunol Cell Biol*. 2006;84(2):138-44.

129. Araújo CA, Perini A, Martins MA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein from *Ascaris suum*, modulates allergic inflammation via IL-10 and IFN- γ , but not IL-12. *Cytokine*. 2008;44(3):335-41.
130. Antunes MFP, Titz TO, Batista IFC, Marques-Porto R, Oliveira CF, Alves de Araujo CA, *et al*. Immunosuppressive PAS-1 is an excretory/secretory protein released by larval and adult worms of the ascarid nematode *Ascaris suum*. *J Helminthol*. 2015;89(3):367-74.
131. Titz TO, de Araújo CAA, Enobe CS, Rigato PO, Oshiro TM, de Macedo-Soares MF. *Ascaris suum* infection modulates inflammation: Implication of CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ T cells and IL-10. *Parasite Immunol*. 2017;39(9):e12453.
132. Silva SR, Jacysyn JF, Macedo MS, Faquim-Mauro EL. Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells *via* an IL-10-mediated mechanism. *Eur J Immunol*. 2006;36(12):3227-37.
133. Almeida S, Nejsun P, Williams AR. Modulation of human macrophage activity by *Ascaris* antigens is dependent on macrophage polarization state. *Immunobiology*. 2018;223(4-5):405-12.
134. Jakobsen SR, Myhill LJ, Williams AR. Effects of *Ascaris* and *Trichuris* antigens on cytokine production in porcine blood mononuclear and epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2019;211:6-9.
135. Hamid B, Ebner F, Bechtold L, Kundik A, Rausch S, Hartmann S. *Ascaris suum* excretory/secretory products differentially modulate porcine dendritic cell subsets. *Front Immunol*. 2022;13:1012717.
136. Abanyie F, Lamb TJ. Implications of *Ascaris* Co-infection. En: Holland C, editora. *Ascaris: the neglected parasite*. 1^a ed. Oxford: Academic Press; 2013. p. 81-103.
137. Koehler S, Springer A, Issel N, Klinger S, Strube C, Breves G. Changes in porcine nutrient transport physiology in response to *Ascaris suum* infection. *Parasit Vectors*. 2021;14:533.
138. Koehler S, Springer A, Issel N, Klinger S, Wendt M, Breves G, *et al*. *Ascaris suum* Nutrient Uptake and Metabolic Release, and Modulation of Host Intestinal Nutrient Transport by Excretory-Secretory and Cuticle Antigens In Vitro. *Pathogens*. 2021;10(11):1419.
139. Vlaminck J, Levecke B, Vercruyssen J, Geldhof P. Advances in the diagnosis of *Ascaris suum* infections in pigs and their possible applications in humans. *Parasitology*. 2014;141(14):1904-11.
140. Sparks AM, Betson M, Oviedo G, Sandoval C, Cooper PJ, Stothard JR. Characterization of *Ascaris* from Ecuador and Zanzibar. *J Helminthol*. 2015;89(4):512-5.
141. Palma A, Ortiz B, Mendoza L, Matamoros G, Gabrie JA, Sánchez AL, *et al*. Molecular analysis of human- and pig-derived *Ascaris* in Honduras. *J Helminthol*. 2019;93(2):154-8.
142. Cavallero S, Rondón S, Monterrosa IA, Šnábel V, Papajová I, Goldová M, *et al*. Genotyping of *Ascaris* spp. infecting humans and pigs in Italy, Slovakia and Colombia. *Infect Genet Evol*. 2021;94:104997.
143. Romano G, Pepe P, Cavallero S, Cociancic P, Di Libero L, Grande G, *et al*. Ascariasis in a 75-year-old man with small bowel volvulus: a case report. *BMC Infect Dis*. 2021;21:1045.
144. Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ. Diagnosing helminthiasis by coprological examination. 3^a ed. Beerse: Janssen Animal Health; 2003.
145. Jungersen G, Eriksen L, Nansen P, Fagerholm HP. Sex-manipulated *Ascaris suum* infections in pigs: implications for reproduction. *Parasitology*. 1997;115(4):439-42.

146. Boes J, Nansen P, Stephenson LS. False-Positive *Ascaris suum* Egg Counts in Pigs. Int J Parasitol. 1997;27(7):833-8.
147. Bernardo TM, Dohoo IR, Ogilvie T. A Critical Assessment of Abattoir Surveillance as a Screening Test for Swine Ascariasis. Can J Vet Res. 1990;54(2):274-7.
148. Joachim A, Winkler C, Ruczizka U, Ladinig A, Koch M, Tichy A, *et al.* Comparison of different detection methods for *Ascaris suum* infection on Austrian swine farms. Porcine Health Manag. 2021;7:57.
149. Yoshihara S, Oya T, Furuya T, Goto N. Use of body fluid of adult female *Ascaris suum* as an antigen in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of swine ascariasis. J Helminthol. 1993;67(4):279-86.
150. Bøgh HO, Eriksen L, Lawson LG, Lind P. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay and a histamine release test system for the detection of pigs naturally infected with *Ascaris suum*. Prev Vet Med. 1994;21(3):201-14.
151. Frontera E, Serrano F, Reina D, Alcaide M, Sánchez-López J, Navarrete I. Serological responses to *Ascaris suum* adult worm antigens in Iberian finisher pigs. J Helminthol. 2003;77(2):167-72.
152. Vlaminck J, Nejsum P, Vangroenweghe F, Thamsborg SM, Vercruyse J, Geldhof P. Evaluation of a serodiagnostic test using *Ascaris suum* haemoglobin for the detection of roundworm infections in pig populations. Vet Parasitol. 2012;189(2-4):267-73.
153. Martínez-Pérez JM, Vandekerckhove E, Vlaminck J, Geldhof P, Martínez-Valladares M. Serological detection of *Ascaris suum* at fattening pig farms is linked with performance and management indices. Vet Parasitol. 2017;248:33-8.
154. Vandekerckhove E, Vlaminck J, Geldhof P. Evaluation of serology to measure exposure of piglets to *Ascaris suum* during the nursery phase. Vet Parasitol. 2017;246:82-7.
155. Egerton JR, DiNetta J, Neu DC, Walther RJ, Campbell WC. The Efficacy of Cambendazole against *Ascaris suum* and *Strongyloides ransomi* in Swine. Res Vet Sci. 1970;11(6):590-2.
156. Marti OG, Stewart TB, Hale OM. Comparative efficacy of fenbendazole, dichlorvos, and levamisole HCl against gastrointestinal nematodes of pigs. J Parasitol. 1978;64(6):1028-31.
157. Kennedy TJ, Conway DP, Bliss DH. Prophylactic medication with pyrantel to prevent liver condemnation in pigs naturally exposed to *Ascaris* infections. Am J Vet Res. 1980;41(12):2089-91.
158. Steffan P, Olaechea F, Roepstorff A, Bjorn H, Nansen P. Efficacy of piperazine dihydrochloride against *Ascaris suum* and *Oesophagostomum* species in naturally infected pigs. Vet Rec. 1988;123(5):128-30.
159. Vanparijs O, Hermans L, Marsboom R. Efficacy of flubendazole against gastrointestinal and lung nematodes in pigs. Vet Rec. 1988;123(13):337-9.
160. Lichtensteiger CA, DiPietro JA, Paul AJ, Neumann EJ, Thompson L. Persistent activity of doramectin and ivermectin against *Ascaris suum* in experimentally infected pigs. Vet Parasitol. 1999;82(3):235-41.
161. Alvarez L, Saumell C, Fusé L, Moreno L, Ceballos L, Domingue G, *et al.* Efficacy of a single high oxfendazole dose against gastrointestinal nematodes in naturally infected pigs. Vet Parasitol. 2013;194(1):70-4.

162. Lopes Wdz, Teixeira WFP, Felippelli G, Cruz BC, Buzulini C, Maciel WG, *et al.* Anthelmintic efficacy of ivermectin and abamectin, administered orally for seven consecutive days (100 µg/kg/day), against nematodes in naturally infected pigs. *Res Vet Sci.* 2014;97(3):546-9.
163. Mendonça RP, Carneiro DO, Baccin EM, Piráquine MR, Zoca SM, Rossa LAF, *et al.* Anthelmintic efficacy of oxibendazole against gastrointestinal nematodes in swine. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2022;31(1):e018321.
164. Bradley RE, Guerrero J, Becker HN, Michael BF, Newcomb K. Flubendazole: dose range and efficacy studies against common internal parasites of swine. *Am J Vet Res.* 1983;44(7):1329-33.
165. Logan NB, Weatherley AJ, Jones RM. Activity of doramectin against nematode and arthropod parasites of swine. *Vet Parasitol.* 1996;66(1-2):87-94.
166. Borgsteede FHM, Gaasenbeek CPH, Nicoll S, Domangue RJ, Abbott EM. A comparison of the efficacy of two ivermectin formulations against larval and adult *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum* in experimentally infected pigs. *Vet Parasitol.* 2007;146(3-4):288-93.
167. Dmitryjuk M, Szczotko M, Kubiak K, Trojanowicz R, Parashchyn Z, Khomitska H, *et al.* S-Methyl-(2-Methoxycarbonylamino-Benzimidazole-5) Thiosulfonate as a Potential Antiparasitic Agent-Its Action on the Development of *Ascaris suum* Eggs In Vitro. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(11):332.
168. Ceballos L, Canton C, Cadenazzi G, Virkel G, Dominguez P, Moreno L, *et al.* Oxfendazole kinetics in pigs: *In vivo* assessment of its pattern of accumulation in *Ascaris suum*. *Exp Parasitol.* 2019;199:52-8.
169. Kreuzig R, Blümlein K, Hölte S. Fate of the Benzimidazole Antiparasitics Flubendazole and Fenbendazole in Manure and Manured Soils. *Clean.* 2007;35(5):488-94.
170. Svendsen TS, Hansen PE, Sommer C, Martinussen T, Grønvold J, Holter P. Life history characteristics of *Lumbricus terrestris* and effects of the veterinary antiparasitic compounds ivermectin and fenbendazole. *Soil Biol Biochem.* 2005;37(5):927-36.
171. Sim WJ, Kim HY, Choi SD, Kwon JH, Oh JE. Evaluation of pharmaceuticals and personal care products with emphasis on anthelmintics in human sanitary waste, sewage, hospital wastewater, livestock wastewater and receiving water. *J Hazard Mater.* 2013;248-249:219-27.
172. Wagil M, Białk-Bielińska A, Puckowski A, Wychodnik K, Maszkowska J, Mulkiewicz E, *et al.* Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015;22:2566-73.
173. Roepstorff A, Bjørn H, Nansen P. Resistance of *Oesophagostomum* spp. in Pigs to Pyrantel Citrate. *Vet Parasitol.* 1987;24(3-4):229-39.
174. Gerwert S, Failing K, Bauer C. Prevalence of levamisole and benzimidazole resistance in *Oesophagostomum* populations of pig-breeding farms in North Rhine-Westphalia, Germany. *Parasitol Res.* 2002;88:63-8.
175. Laugier C, Sevin C, Ménard S, Maillard K. Prevalence of *Parascaris equorum* infection in foals on French stud farms and first report of ivermectin-resistant *P. equorum* populations in France. *Vet Parasitol.* 2012;188(1-2):185-9.
176. Macrelli M, Williamson S, Mitchell S, Pearson R, Andrews L, Morrison AA, *et al.* First detection of ivermectin resistance in *Oesophagostomum dentatum* in pigs. *Vet Parasitol.* 2019;270:1-6.
177. Taffs LF. The Passive Transfer of Immunity in Guinea Pigs Infected with the Nematode *Ascaris suum* Goeze, 1782. *J Helminthol.* 1961;35(3-4):315-8.

178. Taffs LF. Immunological Studies on Experimental Infection of Pigs with *Ascaris suum* Goeze, 1782. I. An Introduction with a Review of the Literature and the Demonstration of Complement-fixing Antibodies in the Serum. *J Helminthol.* 1961;35(3-4):319-44.
179. Tromba FG. Immunization of pigs against experimental *Ascaris suum* infection by feeding ultraviolet-attenuated eggs. *J Parasitol.* 1978;64(4):651-6.
180. Urban JF Jr, Tromba FG. Development of immune responsiveness to *Ascaris suum* antigens in pigs vaccinated with ultraviolet-attenuated eggs. *Vet Immunol Immunopathol.* 1982;3(4):399-409.
181. Hill DE, Fetterer RH, Romanowski RD, Urban JF Jr. The effect of immunization of pigs with *Ascaris suum* cuticle components on the development of resistance to parenteral migration during a challenge infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 1994;42(2):161-9.
182. Urban JF Jr, Romanowski RD. *Ascaris suum*: Protective Immunity in Pigs Immunized with Products from Eggs and Larvae. *Exp Parasitol.* 1985;60(2):245-54.
183. Gazzinelli-Guimarães AC, Gazzinelli-Guimarães PH, Nogueira DS, Oliveira FMS, Barbosa FS, Amorim CCO, *et al.* IgG Induced by Vaccination With *Ascaris suum* Extracts Is Protective Against Infection. *Front Immunol.* 2018;9:2535.
184. Lukes S. *Ascaris suum*-vaccination of mice with liposome encapsulated antigen. *Vet Parasitol.* 1992;43(1-2):105-13.
185. Serrano FJ, Reina D, Frontera E, Roepstorff A, Navarrete I. Resistance against migrating *Ascaris suum* larvae in pigs immunized with infective eggs or adult worm antigens. *Parasitology.* 2001;122(6):699-707.
186. Rhodes MB, Nayak DP, Nelley GW Jr, Marsh CL. Studies in Helminth Enzymology. IV. Immune Responses to Malic Dehydrogenase from *Ascaris suum*. *Exp Parasitol.* 1965;16:373-81.
187. Tsuji N, Suzuki K, Kasuga-Aoki H, Matsumoto Y, Arakawa T, Ishiwata K, *et al.* Intranasal Immunization with Recombinant *Ascaris suum* 14-Kilodalton Antigen Coupled with Cholera Toxin B Subunit Induces Protective Immunity to *A. suum* Infection in Mice. *Infect Immun.* 2001;69(12):7285-92.
188. Tsuji N, Suzuki K, Kasuga-Aoki H, Isobe T, Arakawa T, Matsumoto Y. Mice Intranasally Immunized with a Recombinant 16-Kilodalton Antigen from Roundworm *Ascaris* Parasites Are Protected against Larval Migration of *Ascaris suum*. *Infect Immun.* 2003;71(9):5314-23.
189. Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Isobe T, Yoshihara S, Arakawa T, *et al.* Recombinant *Ascaris* 16-Kilodalton Protein-Induced Protection against *Ascaris suum* Larval Migration after Intranasal Vaccination in Pigs. *J Infect Dis.* 2004;190(10):1812-20.
190. Islam MK, Miyoshi T, Tsuji N. Vaccination with recombinant *Ascaris suum* 24-kilodalton antigen induces a Th1/Th2-mixed type immune response and confers high levels of protection against challenged *Ascaris suum* lung-stage infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol.* 2005;35(9):1023-30.
191. Versteeg L, Wei J, Liu Z, Keegan B, Fujiwara RT, Jones KM, *et al.* Protective immunity elicited by the nematode-conserved As37 recombinant protein against *Ascaris suum* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(2):e0008057.
192. Chen N, Yuan ZG, Xu MJ, Zhou DH, Zhang XX, Zhang YZ, *et al.* *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine.* 2012;30(23):3478-82.

193. de Castro JC, de Almeida LV, Cardoso MS, Oliveira FMS, Nogueira DS, Reis-Cunha JL, *et al.* Vaccination with chimeric protein induces protection in murine model against ascariasis. *Vaccine*. 2021;39(2):394-401.
194. Gazzinelli-Guimarães AC, Nogueira DS, Amorim CCO, Oliveira FMS, Coqueiro-Dos-Santos A, Carvalho SAP, *et al.* ASCVac-1, a Multi-Peptide Chimeric Vaccine, Protects Mice Against *Ascaris suum* Infection. *Front Immunol*. 2021;12:788185.
195. Kaplan RM, Storey BE, Vidyashankar AN, Bissinger BW, Mitchell SM, Howell SB, *et al.* Antiparasitic efficacy of a novel plant-based functional food using an *Ascaris suum* model in pigs. *Acta Trop*. 2014;139:15-22.
196. Williams AR, Fryganas C, Ramsay A, Mueller-Harvey I, Thamsborg SM. Direct Anthelmintic Effects of Condensed Tannins from Diverse Plant Sources against *Ascaris suum*. *PLoS One*. 2014;9(5):e97053.
197. Ramsay A, Williams AR, Thamsborg SM, Mueller-Harvey I. Galloylated proanthocyanidins from shea (*Vitellaria paradoxa*) meal have potent anthelmintic activity against *Ascaris suum*. *Phytochemistry*. 2016;122:146-53.
198. Williams AR, Peña-Espinoza MA, Boas U, Simonsen HT, Enemark HL, Thamsborg SM. Anthelmintic activity of chicory (*Cichorium intybus*): *in vitro* effects on swine nematodes and relationship to sesquiterpene lactone composition. *Parasitology*. 2016;143(6):770-7.
199. Williams AR, Soelberg J, Jäger AK. Anthelmintic properties of traditional African and Caribbean medicinal plants: identification of extracts with potent activity against *Ascaris suum in vitro*. *Parasite*. 2016;23:24.
200. Băieș MH, Gherman C, Boros Z, Olah D, Vlase AM, Cozma-Petruț A, *et al.* The Effects of *Allium sativum* L., *Artemisia absinthium* L., *Cucurbita pepo* L., *Coriandrum sativum* L., *Satureja hortensis* L. and *Calendula officinalis* L. on the Embryogenesis of *Ascaris suum* Eggs during an In Vitro Experimental Study. *Pathogens*. 2022;11(9):1065.
201. Ferreira SR, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR, *et al.* Ovicidal activity of seven *Pochonia chlamydosporia* fungal isolates on *Ascaris suum* eggs. *Trop Anim Health Prod*. 2011;43:639-42.
202. Viña C, Silva MI, Palomero AM, Voinot M, Vilá M, Hernández JÁ, *et al.* The Control of Zoonotic Soil-Transmitted Helminthoses Using Saprophytic Fungi. *Pathogens*. 2020;9(12):1071.
203. Urban JF Jr, Hu Y, Miller MM, Scheib U, Yiu YY, Aroian RV. *Bacillus thuringiensis*-derived Cry5B Has Potent Anthelmintic Activity against *Ascaris suum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(6):e2263.
204. Urban JF Jr, Nielsen MK, Gazzola D, Xie Y, Beshah E, Hu Y, *et al.* An inactivated bacterium (paraprobiotic) expressing *Bacillus thuringiensis* Cry5B as a therapeutic for *Ascaris* and *Parascaris* spp. infections in large animals. *One Health*. 2021;12:100241.
205. Nansen P, Roepstorff A. Parasitic helminths of the pig: factors influencing transmission and infection levels. *Int J Parasitol*. 1999;29(6):877-91.
206. Joachim A, Dülmer N, Dausgschies A, Roepstorff A. Occurrence of helminths in pig fattening units with different management systems in Northern Germany. *Vet Parasitol*. 2001;96(2):135-46.
207. Mejer H, Roepstorff A. *Ascaris suum* infections in pigs born and raised on contaminated paddocks. *Parasitology*. 2006;133(3):305-12.

208. Sanchez-Vazquez MJ, Smith RP, Kang S, Lewis F, Nielen M, Gunn GJ, *et al.* Identification of factors influencing the occurrence of milk spot livers in slaughtered pigs: A novel approach to understanding *Ascaris suum* epidemiology in British farmed pigs. *Vet Parasitol.* 2010;173(3-4):271-9.
209. Roepstorff A, Mejer H, Nejsum P, Thamsborg SM. Helminth parasites in pigs: New challenges in pig production and current research highlights. *Vet Parasitol.* 2011;180(1-2):72-81.
210. Roepstorff A, Nansen P. Epidemiology and control of helminth infections in pigs under intensive and non-intensive production systems. *Vet Parasitol.* 1994;54(1-3):69-85.
211. Urban JF Jr, Romanowski RD, Steele NC. Influence of helminth parasite exposure and strategic application of anthelmintics on the development of immunity and growth of swine. *J Anim Sci.* 1989;67(7):1668-77.
212. Steenhard NR, Jungersen G, Kokotovic B, Beshah E, Dawson HD, Urban JF Jr, *et al.* *Ascaris suum* infection negatively affects the response to a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination and subsequent challenge infection in pigs. *Vaccine.* 2009;27(37):5161-9.
213. Tjørnehøj K, Eriksen L, Aalbaek B, Nansen P. Interaction between *Ascaris suum* and *Pasteurella multocida* in the lungs of mice. *Parasitol Res.* 1992;78:525-8.
214. Adedeji SO, Ogunba EO, Dipeolu OO. Synergistic effect of migrating *Ascaris* larvae and *Escherichia coli* in piglets. *J Helminthol.* 1989;63(1):19-24.
215. Curtis SE, Tisch DA, Todd KS, Simon J. Pulmonary Bacterial Deposition and Clearance during Ascarid Larval Migration in Weanling Pigs. *Can J Vet Res.* 1987;51(4):525-7.
216. Nayak DP, Kelley GW. Synergistic Effect of *Ascaris* Migration and Influenza Infection in Mice. *J Parasitol.* 1965;51(2):297-8.
217. Organisation for Economic Co-operation Development (OECD)/Food and Agricultural Organization (FAO). OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030. Paris: OECD Publishing; 2021.
218. Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. El Sector de la Carne de Cerdo en Cifras. Principales Indicadores Económicos. 2021.
219. Kim SR, Maekawa Y, Matsuoka T, Imoto S, Ando K, Mita K, *et al.* Eosinophilic pseudotumor of the liver due to *Ascaris suum* infection. *Hepato Res.* 2002;23(4):306-14.
220. Sakakibara A, Baba K, Niwa S, Yagi T, Wakayama H, Yoshida K, *et al.* Visceral Larva Migrans Due to *Ascaris suum* Which Presented with Eosinophilic Pneumonia and Multiple Intra-hepatic Lesions with Severe Eosinophil Infiltration –Outbreak in a Japanese Area Other than Kyushu–. *Intern Med.* 2002;41(7):574-9.
221. Kakihara D, Yoshimitsu K, Ishigami K, Irie H, Aibe H, Tajima T, *et al.* Liver lesions of visceral larva migrans due to *Ascaris suum* infection: CT findings. *Abdom Imaging.* 2004;29:598-602.
222. Okada F, Ono A, Ando Y, Yotsumoto S, Yotsumoto S, Tanoue S, *et al.* Pulmonary Computed Tomography Findings of Visceral Larva Migrans Caused by *Ascaris suum*. *J Comput Assist Tomogr.* 2007;31(3):402-8.
223. Inatomi Y, Murakami T, Tokunaga M, Ishiwata K, Nawa Y, Uchino M. Encephalopathy caused by visceral larva migrans due to *Ascaris suum*. *J Neurol Sci.* 1999;164(2):195-9.
224. Umehara F, Ookatsu H, Hayashi D, Uchida A, Douchi Y, Kawabata H, *et al.* MRI studies of spinal visceral larva migrans syndrome. *J Neurol Sci.* 2006;249(1):7-12.

225. Betson M, Nejsum P, Stothard JR. From the Twig Tips to the Deeper Branches: New Insights into Evolutionary History and Phylogeography of *Ascaris*. En: Holland C, editora. *Ascaris: the neglected parasite*. 1ª ed. Oxford: Academic Press; 2013. p. 265-85.
226. Zhou C, Li M, Yuan K, Hu N, Peng W. Phylogeography of *Ascaris lumbricoides* and *A. suum* from China. *Parasitol Res*. 2011;109:329-38.
227. Easton A, Gao S, Lawton SP, Bennuru S, Khan A, Dahlstrom E, *et al*. Molecular evidence of hybridization between pig and human *Ascaris* indicates an interbred species complex infecting humans. *Elife*. 2020;9:e61562.
228. Liu GH, Wu CY, Song HQ, Wei SJ, Xu MJ, Lin RQ, *et al*. Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene*. 2012;492(1):110-6.
229. Shao CC, Xu MJ, Alasaad S, Song HQ, Peng L, Tao JP, *et al*. Comparative analysis of microRNA profiles between adult *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. *BMC Vet Res*. 2014;10:99.
230. Jex AR, Liu S, Li B, Young ND, Hall RS, Li Y, *et al*. Decoding the *Ascaris suum* Genome using Massively Parallel Sequencing and Advanced Bioinformatic Methods – Unprecedented Prospects for Fundamental and Applied Research. En: Holland C, editora. *Ascaris: the neglected parasite*. 1ª ed. Oxford: Academic Press; 2013. p. 287-314.
231. Holland C. *Ascaris: the neglected parasite*. 1ª ed. Oxford: Academic Press; 2013.
232. Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors*. 2014;7:37.
233. Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;386(9995):743-800.
234. Jourdan PM, Lambertson PHL, Fenwick A, Addiss DG. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet*. 2018;391(10117):252-65.
235. Bundy DAP, Medley GF. Immuno-epidemiology of human geohelminthiasis: ecological and immunological determinants of worm burden. *Parasitology*. 1992;104(S1):105-19.
236. Mbangi CM, Ombaku KS, Fai KN, Agbor VN. Small bowel obstruction complicating an *Ascaris lumbricoides* infestation in a 4-year-old male: a case report. *J Med Case Rep*. 2019;13:155.
237. Strunz EC, Addiss DG, Stocks ME, Ogden S, Utzinger J, Freeman MC. Water, Sanitation, Hygiene, and Soil-Transmitted Helminth Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med*. 2014;11(3):e1001620.
238. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000;44(2):333-40.
239. Arnout J, Hoylaerts MF, Lijnen HR. Haemostasis. En: Moncada S, Higgs A. *The Vascular Endothelium II*. 1ª ed. Berlín: Springer; 2006. p. 1-41.
240. van Hinsbergh VWM. Endothelium – role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol*. 2012;34:93-106.
241. Hoffbrand AV, Moss PAH. *Essential Haematology*. 6ª ed. Chichester: Wiley-Blackwell; 2011.
242. Lichtin A, Bartholomew J. *The Coagulation Consult. A Case-Based Guide*. 1ª ed. Nueva York: Springer; 2014.

243. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* 2015;29(1):17-24.
244. Gregory D, Marshall D. Electron micrograph of blood clot. Attribution 4.0 International (CC BY 4.0). Wellcome Collection [Internet]. [Consultado en 2023]. Disponible en: <https://wellcomecollection.org/works/z8me89cj/images?id=be3hen5r>.
245. Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H. The Hemostatic System. *Curr Med Chem.* 2004;11(17):2245-60.
246. Mojzisch A, Brehm MA. The Manifold Cellular Functions of von Willebrand Factor. *Cells.* 2021;10(9):2351.
247. O'Sullivan JM, Ward S, Lavin M, O'Donnell JS. von Willebrand factor clearance - biological mechanisms and clinical significance. *Br J Haematol.* 2018;183(2):185-95.
248. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001;12(5):261-73.
249. Adams RLC, Bird RJ. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology (Carlton).* 2009;14(5):462-70.
250. Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(4):326-36.
251. Butenas S, Mann KG. Blood Coagulation. *Biochemistry (Mosc).* 2002;67(1):3-12.
252. Norris LA. Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003;17(3):369-83.
253. Butenas S. Tissue Factor Structure and Function. *Scientifica (Cairo).* 2012;2012:964862.
254. Mackman N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost.* 2009;7(1):136-9.
255. Holy EW, Tanner FC. Tissue Factor in Cardiovascular Disease: Pathophysiology and Pharmacological Intervention. *Adv Pharmacol.* 2010;59:259-92.
256. Rondon AMR, Kroone C, Kapteijn MY, Versteeg HH, Buijs JT. Role of Tissue Factor in Tumor Progression and Cancer-Associated Thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45(4):396-412.
257. Winter WE, Greene DN, Beal SG, Isom JA, Manning H, Wilkerson G, *et al.* Clotting factors: Clinical biochemistry and their roles as plasma enzymes. *Adv Clin Chem.* 2020;94:31-84.
258. Hedstrom L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem Rev.* 2002;102(12):4501-23.
259. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The Structure and Biological Features of Fibrinogen and Fibrin. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936(1):11-30.
260. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2005;129(3):307-21.
261. Gettins PGW. Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chem Rev.* 2002;102(12):4751-803.
262. Mast AE. Tissue Factor Pathway Inhibitor: Multiple Anticoagulant Activities for a Single Protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(1):9-14.
263. Wood JP, Ellery PER, Maroney SA, Mast AE. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood.* 2014;123(19):2934-43.
264. Ellery PER, Adams MJ. Tissue Factor Pathway Inhibitor: Then and Now. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(8):881-6.

265. Rezaie AR, Giri H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J Thromb Haemost.* 2020;18(12):3142-53.
266. Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN. Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(3):386-9.
267. Olson ST, Richard B, Izaguirre G, Schedin-Weiss S, Gettins PGW. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie.* 2010;92(11):1587-96.
268. Griffin JH, Fernández JA, Gale AJ, Mosnier LO. Activated protein C. *J Thromb Haemost.* 2007;5(1):73-80.
269. Jackson CJ, Xue M. Activated protein C – An anticoagulant that does more than stop clots. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(12):2692-7.
270. Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Activated protein C: biased for translation. *Blood.* 2015;125(19):2898-907.
271. Zhang L, Seiffert D, Fowler BJ, Jenkins GR, Thinnis TC, Loskutoff DJ, *et al.* Plasminogen Has a Broad Extrahepatic Distribution. *Thromb Haemost.* 2002;87(3):493-501.
272. Law RHP, Abu-Ssaydeh D, Whisstock JC. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Curr Opin Struct Biol.* 2013;23(6):836-41.
273. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost.* 2009;7(1):4-13.
274. Castellino FJ, Powell JR. Human Plasminogen. *Methods Enzymol.* 1981;80:365-78.
275. Miles LA, Castellino FJ, Gong Y. Critical Role for Conversion of Glu-Plasminogen to Lys-Plasminogen for Optimal Stimulation of Plasminogen Activation on Cell Surfaces. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13(1):21-30.
276. Syrovets T, Simmet T. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:873-85.
277. Kruithof EKO, Dunoyer-Geindre S. Human tissue-type plasminogen activator. *Thromb Haemost.* 2014;112(2):243-54.
278. Lijnen HR. Elements of the Fibrinolytic System. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936(1):226-36.
279. Zorio E, Gilabert-Estellés J, España F, Ramón LA, Cosín R, Estellés A. Fibrinolysis: The Key to New Pathogenetic Mechanisms. *Curr Med Chem.* 2008;15(9):923-9.
280. Gebbink MFBG. Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2011;9(1):174-81.
281. Yepes M, Lawrence DA. New Functions for an Old Enzyme: Nonhemostatic Roles for Tissue-Type Plasminogen Activator in the Central Nervous System. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004;229(11):1097-104.
282. Stepanova VV, Tkachuk VA. Urokinase as a Multidomain Protein and Polyfunctional Cell Regulator. *Biochemistry (Mosc).* 2002;67(1):109-18.
283. Vincenza-Carriero M, Franco P, Vocca I, Alfano D, Votta G, Longanesi-Cattani I, *et al.* Structure, function and antagonists of urokinase-type plasminogen activator. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14(10):3782-94.

284. Fuhrman B. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;222(1):8-14.
285. Madunić J. The Urokinase Plasminogen Activator System in Human Cancers: An Overview of Its Prognostic and Predictive Role. *Thromb Haemost*. 2018;118(12):2020-36.
286. Buckley BJ, Ali U, Kelso MJ, Ranson M. The Urokinase Plasminogen Activation System in Rheumatoid Arthritis: Pathophysiological Roles and Prospective Therapeutic Targets. *Curr Drug Targets*. 2019;20(9):970-81.
287. Gils A, Declerck PJ. Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Curr Med Chem*. 2004;11(17):2323-34.
288. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost*. 2005;3(1):35-45.
289. Cale JM, Lawrence DA. Structure-Function Relationships of Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its Potential as a Therapeutic Agent. *Curr Drug Targets*. 2007;8(9):971-81.
290. Sillen M, Declerck PJ. A Narrative Review on Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its (Patho)Physiological Role: To Target or Not to Target? *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2721.
291. Schaller J, Gerber SS. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:785-801.
292. Coughlin PB. Antiplasmin. The forgotten serpin? *FEBS J*. 2005;272(19):4852-7.
293. Sillen M, Declerck PJ. Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI): An Updated Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):3670.
294. Plug T, Meijers JCM. Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost*. 2016;14(4):633-44.
295. Miles LA, Ny L, Wilczynska M, Shen Y, Ny T, Parmer RJ. Plasminogen Receptors and Fibrinolysis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1712.
296. 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.
297. Keragala CB, Medcalf RL. Plasminogen: an enigmatic zymogen. *Blood*. 2021;137(21):2881-9.
298. Foley JH. Plasmin(ogen) at the Nexus of Fibrinolysis, Inflammation, and Complement. *Semin Thromb Hemost*. 2017;43(2):135-42.
299. Baker SK, Strickland S. A critical role for plasminogen in inflammation. *J Exp Med*. 2020;217(4):e20191865.
300. Heissig B, Salama Y, Osada T, Okumura K, Hattori K. The Multifaceted Role of Plasminogen in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2304.
301. Grant MJ, Booth A. A typology of reviews: an analysis of 14 review types and associated methodologies. *Health Info Libr J*. 2009;26(2):91-108.
302. Peters MDJ, Godfrey CM, Khalil H, McInerney P, Parker D, Soares CB. Guidance for conducting systematic scoping reviews. *Int J Evid Based Healthc*. 2015;13(3):141-6.
303. Munn Z, Peters MDJ, Stern C, Tufanaru C, McArthur A, Aromataris E. Systematic review or scoping review? Guidance for authors when choosing between a systematic or scoping review approach. *BMC Med Res Methodol*. 2018;18:143.

304. Tricco AC, Lillie E, Zarin W, O'Brien KK, Colquhoun H, Levac D, *et al.* PRISMA Extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR): Checklist and Explanation. *Ann Intern Med.* 2018;169(7):467-73.
305. Sharma A, Kumar G, Sharma S, Walia K, Chouhan P, Mandal B, *et al.* Methods for binding analysis of small GTP-binding proteins with their effectors. *Methods Cell Biol.* 2021;166:235-50.
306. Vlaminck J, Masure D, Wang T, Nejsum P, Hokke CH, Geldhof P. A Phosphorylcholine-Containing Glycolipid-like Antigen Present on the Surface of Infective Stage Larvae of *Ascaris* spp. Is a Major Antibody Target in Infected Pigs and Humans. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(12):e0005166.
307. Urban JF Jr, Douvres FW, Tromba FG. A Rapid Method for Hatching *Ascaris suum* Eggs In Vitro. *Proc Helminthol Soc Wash.* 1981;48(2):241-3.
308. Wedrychowicz H, Holmes PH, Bairden K, Tait A. Surface and excretory/secretory antigens of fourth-stage larvae and adult *Ostertagia circumcincta*. *Vet Parasitol.* 1994;53(1-2):117-32.
309. Maizels RM, Blaxter ML, Robertson BD, Selkirk ME. *Parasite Antigens, Parasite Genes. A Laboratory Manual for Molecular Parasitology.* Cambridge: Cambridge University Press; 1991.
310. 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.
311. Gan W, Deng L, Yang C, He Q, Hu J, Yin H, *et al.* An anticoagulant peptide from the human hookworm, *Ancylostoma duodenale* that inhibits coagulation factors Xa and XIa. *FEBS Lett.* 2009;583(12):1976-80.
312. Ramajo-Hernández A, Pérez-Sánchez R, Ramajo-Martín V, Oleaga A. *Schistosoma bovis*: Plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Exp Parasitol.* 2007;115(1):83-91.
313. 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.
314. Fonseca FPP, Ike PTL, Assis DM, Icimoto MY, Juliano MA, Juliano L, *et al.* Leviserpin: A Serine Peptidase Inhibitor (Serp) from the Sugarcane Weevil *Sphenophorus levis*. *Protein J.* 2011;30:404-12.
315. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, *et al.* Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(25):14440-5.
316. Shilov IV, Seymour SL, Patel AA, Loboda A, Tang WH, Keating SP, *et al.* The Paragon Algorithm, a Next Generation Search Engine That Uses Sequence Temperature Values and Feature Probabilities to Identify Peptides from Tandem Mass Spectra. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6(9):1638-55.
317. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol.* 2004;340(4):783-95.
318. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 2006;22(2):195-201.

319. Stutzer C, Richards SA, Ferreira M, Baron S, Maritz-Olivier C. Metazoan Parasite Vaccines: Present Status and Future Prospects. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:67.
320. González-Miguel J, Becerro-Recio D, Siles-Lucas M. Insights into *Fasciola hepatica* Juveniles: Crossing the Fasciolosis Rubicon. *Trends Parasitol.* 2021;37(1):35-47.
321. Knoll AH, Carroll SB. Early Animal Evolution: Emerging Views from Comparative Biology and Geology. *Science.* 1999;284(5423):2129-37.
322. Zang X, Maizels RM. Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(3):191-7.
323. 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.
324. Chmelař J, Kotál J, Langhansová H, Kotsyfakis M. Protease Inhibitors in Tick Saliva: The Role of Serpins and Cystatins in Tick-host-Pathogen Interaction. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:216.
325. Ayón-Núñez DA, Fragoso G, Bobes RJ, Laclette JP. Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases. *Biosci Rep.* 2018;38(5):BSR20180705.
326. Schmid-Hempel P. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009;364(1513):85-98.
327. Jeffery CJ. Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci.* 1999;24(1):8-11.
328. Balmer EA, Faso C. The Road Less Traveled? Unconventional Protein Secretion at Parasite-Host Interfaces. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:662711.
329. 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.
330. Ginger ML. Protein moonlighting in parasitic protists. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(6):1734-9.
331. Karkowska-Kuleta J, Kozik A. Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. *Mol Oral Microbiol.* 2014;29(6):270-83.
332. Miles LA, Hawley SB, Baik N, Andronicos NM, Castellino FJ, Parmer RJ. Plasminogen receptors: the *sine qua non* of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci.* 2005;10:1754-62.
333. UniProt [Internet]. [Consultado en 2022]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/>.
334. Knox DP, Redmond DL, Jones DG. Characterization of proteinases in extracts of adult *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal nematode. *Parasitology.* 1993;106(4):395-404.
335. Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, *et al.* Human and Animal Dirofilariasis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(3):507-44.
336. Leontovyč 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.
337. Antoniuk S. The coagulation system in host defense. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2(3):549-57.

338. Chung MC, Tonry JH, Narayanan A, Manes NP, Mackie RS, Gutting B, *et al.* *Bacillus anthracis* Interacts with Plasmin(ogen) to Evade C3b-Dependent Innate Immunity. *PLoS One*. 2011;6(3):e18119.
339. Vieira ML, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Romero EC, Nascimento ALTO. *In vitro* evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. *Microb Pathog*. 2011;51(5):360-5.
340. Ly D, Taylor JM, Tsatsaronis JA, Monteleone MM, Skora AS, Donald CA, *et al.* Plasmin(ogen) Acquisition by Group A *Streptococcus* Protects against C3b-Mediated Neutrophil Killing. *J Innate Immun*. 2014;6(2):240-50.
341. Singh B, Al-Jubair T, Voraganti C, Andersson T, Mukherjee O, Su YC, *et al.* *Moraxella catarrhalis* Binds Plasminogen To Evade Host Innate Immunity. *Infect Immun*. 2015;83(9):3458-69.
342. Eberhard T, Kronvall G, Ullberg M. Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb Pathog*. 1999;26(3):175-81.
343. Yavlovich A, Katzenell A, Tarshis M, Higazi AA, Rottem S. *Mycoplasma fermentans* Binds to and Invades HeLa Cells: Involvement of Plasminogen and Urokinase. *Infect Immun*. 2004;72(9):5004-11.
344. Stie J, Bruni G, Fox D. Surface-Associated Plasminogen Binding of *Cryptococcus neoformans* Promotes Extracellular Matrix Invasion. *PLoS One*. 2009;4(6):e5780.
345. Bergmann S, Schoenen H, Hammerschmidt S. The interaction between bacterial enolase and plasminogen promotes adherence of *Streptococcus pneumoniae* to epithelial and endothelial cells. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(8):452-62.
346. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Yamaguchi M, Kawabata S. Group A *Streptococcus* exploits human plasminogen for bacterial translocation across epithelial barrier via tricellular tight junctions. *Sci Rep*. 2016;6:20069.
347. Kitt AJ, Leigh JA. The auxotrophic nature of *Streptococcus uberis*. The acquisition of essential acids from plasmin derived casein peptides. *Adv Exp Med Biol*. 1997;418:647-50.
348. 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? *Parasit Vectors*. 2015;8:194.
349. 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.
350. 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.
351. Alves e Silva TL, Radtke A, Balaban A, Pascini TV, Pala ZR, Roth A, *et al.* The fibrinolytic system enables the onset of *Plasmodium* infection in the mosquito vector and the mammalian host. *Sci Adv*. 2021;7(6):eabe3362.
352. Van Den Abbeele J, Caljon G, De Ridder K, De Baetselier P, Coosemans M. *Trypanosoma brucei* Modifies the Tsetse Salivary Composition, Altering the Fly Feeding Behavior That Favors Parasite Transmission. *PLoS Pathog*. 2010;6(6):e1000926.
353. Ghosh AK, Coppens I, Gårdsvoll H, Ploug M, Jacobs-Lorena M. *Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(41):17153-8.

354. Rojas M, Labrador I, Concepción JL, Aldana E, Avilan L. Characteristics of plasminogen binding to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Acta Trop.* 2008;107(1):54-8.
355. González-Miguel J. Host-Parasite Relationships in Veterinary Parasitology: Get to Know Your Enemy before Fighting It. *Animals (Basel).* 2022;12(4):448.
356. Othman M, Kaur H. Thromboelastography (TEG). En: Favaloro EJ, Lippi G, editores. *Hemostasis and Thrombosis. Methods and Protocols.* 1ª ed. Nueva York: Springer; 2017. p. 533-43.
357. Fredenburgh JC, Weitz JI. New anticoagulants: Moving beyond the direct oral anticoagulants. *J Thromb Haemost.* 2021;19(1):20-9.
358. Lee A, Agnelli G, Büller H, Ginsberg J, Heit J, Rote W, *et al.* Dose-Response Study of Recombinant Factor VIIa/Tissue Factor Inhibitor Recombinant Nematode Anticoagulant Protein c2 in Prevention of Postoperative Venous Thromboembolism in Patients Undergoing Total Knee Replacement. *Circulation.* 2001;104(1):74-8.
359. Moons AHM, Peters RJG, Bijsterveld NR, Piek JJ, Prins MH, Vlasuk GP, *et al.* Recombinant Nematode Anticoagulant Protein c2, an Inhibitor of the Tissue Factor/Factor VIIa Complex, in Patients Undergoing Elective Coronary Angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(12):2147-53.
360. Giugliano RP, Wiviott SD, Stone PH, Simon DI, Schweiger MJ, Bouchard A, *et al.* Recombinant Nematode Anticoagulant Protein c2 in Patients With Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndrome. The ANTHEM-TIMI-32 Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(25):2398-407.
361. Hess CN, Capell WH, Bristow MR, Ruf W, Szarek M, Morrow DA, *et al.* Rationale and design of a study to assess the safety and efficacy of rNAPc2 in COVID-19: the Phase 2b ASPEN-COVID-19 trial. *Am Heart J.* 2022;246:136-43.
362. Crawford GPM, Howse DJ, Grove DI. Inhibition of human blood clotting by extracts of *Ascaris suum*. *J Parasitol.* 1982;68(6):1044-7.
363. Spellman GG Jr, Nossel HL. Anticoagulant activity of dog hookworm. *Am J Physiol.* 1971;220(4):922-7.
364. Ranasinghe SL, Fischer K, Gobert GN, McManus DP. Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Parasit Vectors.* 2015;8:408.
365. Diosdado A, Simón F, Morchón R, González-Miguel J. *Dirofilaria immitis* possesses molecules with anticoagulant properties in its excretory/secretory antigens. *Parasitology.* 2020;147(5):559-65.
366. Malla N, Sofi BA, Ganguly NK, Mahajan RC. *In vitro* effect of larval stages of *Ascaris lumbricoides* on human blood clotting. *J Helminthol.* 1991;65(2):133-40.
367. Núñez-Navarro NE, Santana FM, Parra LP, Zacconi FC. Surfing the Blood Coagulation Cascade: Insight into the Vital Factor Xa. *Curr Med Chem.* 2019;26(17):3175-200.
368. Stark KR, James AA. Anticoagulants in Vector Arthropods. *Parasitol Today.* 1996;12(11):430-7.
369. Kazimírová M, Šulanová M, Kozánek M, Takáč P, Labuda M, Nuttall PA. Identification of Anticoagulant Activities in Salivary Gland Extracts of Four Horsefly Species (Diptera, Tabanidae). *Haemostasis.* 2001;31(3-6):294-305.

370. Chlastáková A, Kotál J, Beránková Z, Kaščáková B, Martins LA, Langhansová H, *et al.* Iripin-3, a New Salivary Protein Isolated From *Ixodes ricinus* Ticks, Displays Immunomodulatory and Anti-Hemostatic Properties *In Vitro*. *Front Immunol.* 2021;12:626200.
371. Kotál J, Polderdijk SGI, Langhansová H, Ederová M, Martins LA, Beránková Z, *et al.* *Ixodes ricinus* Salivary Serpin Iripin-8 Inhibits the Intrinsic Pathway of Coagulation and Complement. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17):9480.
372. Pérez de León AA, Valenzuela JG, Tabachnick WJ. Anticoagulant Activity in Salivary Glands of the Insect Vector *Culicoides variipennis sonorensis* by an Inhibitor of Factor Xa. *Exp Parasitol.* 1998;88(2):121-30.
373. Francischetti IMB, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JMC. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood.* 2002;99(10):3602-12.
374. Campos ITN, Tanaka-Azevedo AM, Tanaka AS. Identification and characterization of a novel factor XIIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *FEBS Lett.* 2004;577(3):512-6.
375. Kim TK, Tirloni L, Radulovic Z, Lewis L, Bakshi M, Hill C, *et al.* Conserved *Amblyomma americanum* tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions. *Int J Parasitol.* 2015;45(9-10):613-27.
376. Brahma RK, Blanchet G, Kaur S, Manjunatha Kini R, Doley R. Expression and characterization of haemathrins, madanin-like thrombin inhibitors, isolated from the salivary gland of tick *Haemaphysalis bispinosa* (Acari: Ixodidae). *Thromb Res.* 2017;152:20-9.
377. Knox DP. Proteinase inhibitors and helminth parasite infection. *Parasite Immunol.* 2007;29(2):57-71.
378. Ibelli AMG, Kim TK, Hill CC, Lewis LA, Bakshi M, Miller S, *et al.* A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting. *Int J Parasitol.* 2014;44(6):369-79.
379. Tirloni L, Kim TK, Coutinho ML, Ali A, Seixas A, Termignoni C, *et al.* The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. *Insect Biochem Mol Biol.* 2016;71:12-28.
380. Calcagno M, Avilan L, Colasante C, Berrueta L, Salmen S. Interaction of different *Leishmania mexicana* morphotypes with plasminogen. *Parasitol Res.* 2002;88:972-8.
381. Acosta H, Rondón-Mercado R, Avilán L, Concepción JL. Interaction of *Trypanosoma evansi* with the plasminogen-plasmin system. *Vet Parasitol.* 2016;226:189-97.
382. Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Højrup P, Everitt L, *et al.* Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(6):2811-6.
383. 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.
384. 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;113:2743-55.

385. Zhang S, Guo A, Zhu X, You Y, Hou J, Wang Q, *et al.* Identification and functional characterization of alpha-enolase from *Taenia pisiformis* metacestode. *Acta Trop.* 2015;144:31-40.
386. 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;50:106.
387. Almeida L, Vanegas G, Calcagno M, Concepción JL, Avilan L. Plasminogen Interaction with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(1):63-7.
388. Mundodi V, Kucknoor AS, Alderete JF. Immunogenic and Plasminogen-Binding Surface-Associated α -Enolase of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.* 2008;76(2):523-31.
389. 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.
390. Assumpção TC, Mizurini DM, Ma D, Monteiro RQ, Ahlstedt S, Reyes M, *et al.* Ixonnexin from Tick Saliva Promotes Fibrinolysis by Interacting with Plasminogen and Tissue-Type Plasminogen Activator, and Prevents Arterial Thrombosis. *Sci Rep.* 2018;8:4806.
391. Bergmann S, Hammerschmidt S. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost.* 2007;98(3):512-20.
392. Lähteenmäki K, Kuusela P, Korhonen TK. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev.* 2001;25(5):531-52.
393. Bhattacharya S, Ploplis VA, Castellino FJ. Bacterial Plasminogen Receptors Utilize Host Plasminogen System for Effective Invasion and Dissemination. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:482096.
394. Martzen MR, Geise GL, Peanasky RJ. *Ascaris suum*: Immunoperoxidase and Fluorescent Probe Analysis of Host Proteases and Parasite Proteinase Inhibitors in Developing Eggs and Second Stage Larvae. *Exp Parasitol.* 1986;61(2):138-45.

ANEXOS

Anexo I

Datos de prevalencia de *Ascaris suum* en cerdos domésticos y jabalís, según la bibliografía revisada en la presente Tesis Doctoral.

Continente	Localización geográfica		Periodo	Prevalencia (%)	Unidad muestral	Tipo de análisis	Referencia bibliográfica
	País	Región					
África	Botsuana	Distrito Sudeste	-	54,6	Cerdo	Coprológico	(1)
	Burkina Faso	Tenkodogo	2001-2002	40,4	Cerdo	Coprológico	(2)
	Camerún	Dpto. de Menoua	2016	11,6	Cerdo	Coprológico	(3)
	Etiopía	Región de Oromia	2007-2008	13,9	Cerdo	Coprológico	(4)
		Bishoftu	2011-2012	4,9	Cerdo	Coprológico	(5)
		Región de Tigray	2012	25,9	Cerdo	Coprológico	(6)
	Gabón	Provincia de Haut-Ogooué	2018	5,1	Cerdo	Coprológico	(7)
	Ghana	Región del Alto Oriente	1997	12,7	Cerdo	Coprológico	(8)
		Municipio de Ejisu	2013	2	Cerdo	Coprológico	(9)
	Kenia	Provincias Central, de Nairobi, Nyanza y Valle del Rift	2005-2006	28,7	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino)	(10)
		Distrito de Busia	2007	17,6	Cerdo	Coprológico	(11)
		Distrito de Busia	2007	30,4	Granja	Coprológico	(11)
	Mozambique	Distrito de Angónia	2014	12,2	Cerdo	Coprológico	(12)
	Nigeria	Estado de Plateau	1982	90,4	Cerdo	Coprológico	(13)
		Jos	1987-1988	53,1	Cerdo	Coprológico	(14)
		Port Harcourt	1987-1988	10,4	Cerdo	Coprológico	(14)
		Ibadan	2010	11,1	Cerdo	Coprológico	(15)
		Nsukka	2012	31,1	Cerdo	Coprológico	(16)
		Estado de Nasarawa	2015	16,5	Cerdo	Coprológico	(17)
		AGL de Umuahia North	2017	14,7	Cerdo	Coprológico	(18)
	Ruanda	Distrito de Nyagatare	2019	10,6	Cerdo	Coprológico	(19)
	Sudáfrica	Municipio Metropolitano de Mangaung	2016	44,5	Cerdo	Coprológico	(20)
	Tanzania	Región de Morogoro	1993-1994	11,6	Cerdo	Coprológico	(21)
		Regiones de Arusha, Kilimanjaro, Manyara y Singida	1997-1998	44,3	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(22)
Región de Arusha		2005-2007	4	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(23)	
Regiones de Dar es Salaam, Dodoma, Kilimanjaro, Manyara, Mbeya, Morogoro, Rukwa, Singida y Tanga		2007-2008	8,1	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(24)	

ANEXOS

	Distritos de Mbozi y Mbeya Rural	2007-2008	17,5	Cerdo	Coprológico	(25)
Uganda	Distrito de Kabale	2007	39,6	Cerdo	Coprológico	(26)
	Distritos de Masaka, Mukono y Kamuli	2013	5,9	Cerdo	Coprológico	(27)
Zimbabue	Harare	1984-1985	17,5	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(28)
	Harare	1990-1991	17	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(28)
	Hama-Mavhaire	2005-2006	7	Cerdo	Coprológico	(29)
Belice	Distritos de Belice, Cayo, Orange Walk y Toledo	1985-1986	24,1	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino)	(30)
Brasil	Estado de Minas Gerais	2011-2013	9,8	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(31)
	Municipio de Cachoeiras de Macacu	2020-2021	32,2	Cerdo	Coprológico	(32)
	Estado de Paraná	2014	4,6	Cerdo	Coprológico	(33)
	Estado de Paraná	2014	58,1	Granja	Coprológico	(33)
	Estado de San Paulo	2001-2002	2	Jabalí	<i>Post mortem</i> (intestino)	(34)
	Antônio Prado	2010-2011	47,5	Jabalí	<i>Post mortem</i> (intestino)	(35)
América	Isla del Príncipe Eduardo	-	32,1	Cerdo	Coprológico	(36)
	Isla del Príncipe Eduardo	-	34,5	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino)	(36)
	Isla del Príncipe Eduardo	-	82,4	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(36)
	Provincia de Quebec	1969-1971	29	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino)	(37)
	Saskatchewan	1980	36,7	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino)	(38)
	Saskatchewan	1980	45,9	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(38)
	Saskatchewan	1980	59,8	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino y/o hígado)	(38)
	Saskatchewan	1995	17,6	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino)	(39)
	Saskatchewan	1995	50,2	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(39)
	Saskatchewan	1995	53,4	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino y/o hígado)	(39)
Saskatchewan	1995	72	Granja	<i>Post mortem</i> (intestino y/o hígado)	(39)	
Chile	Cuenca del río Valdivia	1987	25,4	Cerdo	Coprológico	(40)

ANEXOS

	Estados de Iowa, Minnesota, Pennsylvania y Wisconsin	2019	40,9	Cerdo	Coprológico	(41)
Estados Unidos	Estados de Iowa, Minnesota, Pennsylvania y Wisconsin	2019	88,9	Granja	Coprológico	(41)
	Estado de Kansas	1993-1994	20	Jabalí	<i>Post mortem</i> (intestino)	(42)
México	Estados de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala	-	32,2	Jabalí	Serológico	(43)
Nicaragua	Municipio de El Sauce	-	45,9	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino)	(44)
	Subdistrito de Mymensingh Sadar	2013	50,9	Cerdo	Coprológico	(45)
	Subdistrito de Mymensingh Sadar	2013	65	Cerdo	<i>Post mortem</i> (visceras)	(45)
Bangladés	Subdistritos de Birganj y Kaharol	2014	38	Cerdo	Coprológico	(46)
	Divisiones de Chattogram, Dhaka y Sylhet	2020-2021	79,7	Cerdo	Coprológico	(47)
Camboya	Ang Svay Check	2011	13,3	Cerdo	Coprológico	(48)
	Distrito de Xinjian	1993-1994	58,6	Cerdo	Coprológico	(49)
	Distrito de Zhiyang	-	36,7	Cerdo	Coprológico	(50)
China	Provincia de Guangdong	2000-2002	5,2	Cerdo	Coprológico	(51)
	Chongqing	2007-2009	12,2	Cerdo	Coprológico	(52)
	Provincia de Sichuan	2015-2017	60,7	Cerdo	Serológico	(53)
	-	-	25,6	Cerdo	Coprológico	(54)
	-	1980-1981	29	Cerdo	Coprológico	(55)
	Provincia de Chungcheongnam-do	2009-2010	17,6	Cerdo	Coprológico	(56)
Corea del Sur	Provincias de Chungcheong del Norte y del Sur, Gyeonggi, Gyeongsang del Norte y del Sur, Jeolla del Norte y del Sur	2020-2021	3,8	Cerdo	Coprológico	(57)
	Distrito de Ri-Bhoi	2011-2012	61,3	Cerdo	Coprológico	(58)
	Región de Shimoga	-	7,3	Cerdo	Coprológico	(59)
	Región de Mumbai	2013-2014	32,6	Cerdo	Coprológico	(60)
	Región de Jabalpur	-	37,1	Cerdo	Coprológico	(61)
India	Estado de Punjab	-	27,5	Cerdo	Coprológico	(62)
	Estado de Punjab	-	11,1	Cerdo	Coprológico	(63)
	Distritos de East y West Khasi Hills	1986-1987	51,7	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino)	(64)
	Región de Mumbai	-	15,6	Cerdo	<i>Post mortem</i> (visceras)	(65)

ANEXOS

	Estados de Gujarat y Maharashtra	-	4,4	Cerdo	<i>Post mortem</i> (visceras)	(66)	
Indonesia	Región de Jayawijaya	2013	9,1	Cerdo	<i>Post mortem</i> (visceras)	(67)	
	Subdistrito de Wamena	-	11,8	Cerdo	Coprológico	(67)	
Irán	Provincia de Mazandaran	2012-2014	4,8	Jabalí	<i>Post mortem</i> (visceras) y coprológico	(68)	
Japón	Prefecturas de Fukui, Gifu, Hyogo, Kyoto, Mie, Nara, Okayama y Wakayama	2004-2007	14,7	Cerdo	Coprológico	(69)	
	Prefecturas de Hyogo y Wakayama	2005-2006	27,6	Jabalí	<i>Post mortem</i> (intestino)	(70)	
Malasia	Estado de Selangor	2004	15,8	Cerdo	Coprológico	(71)	
Tailandia	Subdistrito de Mae Usu	2012	31,3	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino)	(72)	
Timor Oriental	Distritos de Aileu, Bobonaro y Viqueue	2014	29,9	Cerdo	Coprológico	(73)	
Alemania	-	1998-2002	1,5	Cerdo	Coprológico	(74)	
	-	2003-2012	1,6	Cerdo	Coprológico	(75)	
	Sur	-	12,1	Jabalí	<i>Post mortem</i> (visceras)	(76)	
Austria	Estado de Baja Austria	2019	22	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(77)	
	Estado de Baja Austria	2019	72,2	Granja	<i>Post mortem</i> (hígado)	(77)	
	Estado de Baja Austria	2019	7,4	Cerdo	Coprológico	(77)	
	Estado de Baja Austria	2019	44,4	Granja	Coprológico	(77)	
	Estado de Baja Austria	2019	68,9	Cerdo	Serológico	(77)	
	Estado de Baja Austria	2019	100	Granja	Serológico	(77)	
Bélgica	-	-	35,7	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(78)	
Europa	Bulgaria	Provincias de Blagoevgrad, Kyustendil, Pazardzhik, Pernik, Shumen, Smolyan y Sofía	2016-2017	7,5	Jabalí	Coprológico	(79)
		Fionia, Jutlandia y Selandia	1982-1984	87,9	Piara	Coprológico	(80)
Dinamarca	-	1993	8,9	Cerdo	Coprológico	(81)	
	-	1993	60,2	Piara	Coprológico	(81)	
	-	1993	75	Piara	Coprológico	(82)	
	-	1993	100	Piara	Serológico	(82)	
	-	-	75,9	Granja	Coprológico	(83)	
	Jutlandia	2014-2019	10,6	Jabalí	Coprológico	(84)	

	Andalucía, Aragón, Castilla La Mancha, Castilla y León, Cataluña, Comunidad Valenciana, La Rioja, Murcia y Navarra	2018	10,2	Cerdo	<i>Post mortem</i> (visceras)	(85)
	Extremadura	-	28,7	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino e hígado) y coprológico	(86)
	Extremadura	-	61,1	Cerdo	<i>Post mortem</i> (intestino) y coprológico	(87)
España	Extremadura	-	93,8	Granja	<i>Post mortem</i> (intestino) y coprológico	(87)
	Norte	-	25,4	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(88)
	Norte	-	57,1	Granja	<i>Post mortem</i> (hígado)	(88)
	Norte	-	47,6	Granja	Serológico	(88)
	Norte	-	85,7	Granja	Serológico	(88)
	Salamanca	2017-2018	44,8	Granja	Coprológico	(89)
	Valencia	1999	85,1	Jabalí	<i>Post mortem</i> (intestino)	(90)
	Huelva	2010-2012	25,1	Jabalí	<i>Post mortem</i> (intestino) y coprológico	(91)
Estonia	Isla de Saaremaa	-	9	Jabalí	<i>Post mortem</i> (visceras) y coprológico	(92)
	-	2020-2021	16	Granja	Coprológico	(93)
	-	2020-2021	43	Granja	Serológico	(93)
Francia	-	-	44,4	Jabalí	<i>Post mortem</i> (visceras)	(94)
	-	-	11,1	Jabalí	Coprológico	(94)
Grecia	Norte	2017-2018	3,7	Cerdo	Coprológico	(95)
	Noroeste	-	74,8	Granja	<i>Post mortem</i> (hígado)	(96)
Italia	Provincia de Parma	-	30,4	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(97)
	Provincia de Parma	-	70,3	Cerdo	Serológico	(97)
	Provincia de Parma	-	82,2	Cerdo	Serológico	(97)
	Provincia de Catanzaro	2014-2015	88,3	Jabalí	Coprológico	(98)
Países Bajos	-	2001-2002	17,3	Cerdo	Coprológico	(99)
	-	2001-2002	47,2	Granja	Coprológico	(99)
Países Nórdicos	Dinamarca, Finlandia, Islandia, Noruega y Suecia	-	9,6	Cerdo	Coprológico	(100)
	Dinamarca, Finlandia, Islandia, Noruega y Suecia	-	46,5	Granja	Coprológico	(100)

ANEXOS

Polonia	Todas las provincias	-	3,5	Cerdo	Coprológico	(101)	
	Todas las provincias	-	28,6	Granja	Coprológico	(101)	
Reino Unido	Gran Bretaña	2005-2007	4,4	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(102)	
	Gran Bretaña	2005-2007	67	Granja	<i>Post mortem</i> (hígado)	(102)	
	Gales e Inglaterra	2005-2007	3,7	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(102)	
	Gales e Inglaterra	2005-2007	71,9	Granja	<i>Post mortem</i> (hígado)	(102)	
	Inglaterra	2005-2010	4,2	Cerdo	<i>Post mortem</i> (hígado)	(103)	
	Rumanía	Distrito de Cluj	2021	32,4	Cerdo	Coprológico	(104)
Rusia	Primorsky Krai	2017-2018	3	Jabalí	Coprológico	(105)	
Serbia	Distritos de Braničevo, Nišava, North Bačka, South Banat y Zlatibor	2007-2011	47,6	Cerdo	Coprológico	(106)	
	Provincia de Vojvodina	2016-2019	12,3	Jabalí	Coprológico	(107)	
Suecia	-	2018-2020	43	Granja	Coprológico	(108)	
	-	2014	0,8	Cerdo	Coprológico	(109)	
	-	2014	1,4	Granja	Coprológico	(109)	
Suiza	Cantones de Aargau, Schaffhausen, Ticino, Thurgau y Zürich	2018	3,6	Jabalí	Coprológico	(110)	
Turquía	Corlu, Estambul y Tekirdağ	-	3,8	Cerdo	Coprológico	(111)	
Oceanía	Australia	Australia Occidental	1982-1984	45,5	Granja	Coprológico	(112)

1. Nsoso SJ, Mosala KP, Ndebele RT, Ramabu SS. The prevalence of internal and external parasites in pigs of different ages and sexes in Southeast District, Botswana. *Onderstepoort J Vet Res.* 2000;67(3):217-20.
2. Tamboura HH, Banga-Mboko H, Maes D, Youssao I, Traore A, Bayala B, *et al.* Prevalence of common gastrointestinal nematode parasites in scavenging pigs of different ages and sexes in eastern centre province, Burkina Faso. *Onderstepoort J Vet Res.* 2006;73(1):53-60.
3. Kouam MK, Ngueguim FD. Prevalence, Intensity, and Risk Factors for Helminth Infections in Pigs in Menoua, Western Highlands of Cameroon, with Some Data on Protozoa. *J Parasitol Res.* 2022;2022:9151294.
4. Abdu S, Gashaw A. Production system dynamism and parasitic interaction of swine in and around Holetta, Ethiopia. *Ethiop Vet J.* 2010;14(1):71-81.
5. Jufare A, Awol N, Tadesse F, Tsegaye Y, Hadush B. Parasites of pigs in two farms with poor husbandry practices in Bishoftu, Ethiopia. *Onderstepoort J Vet Res.* 2015;82(1):839.
6. Tomass Z, Imam E, Kifleyohannes T, Tekle Y, Weldu K. Prevalence of gastrointestinal parasites and *Cryptosporidium* species in extensively managed pigs in Mekelle and urban areas of southern zone of Tigray region, Northern Ethiopia. *Vet World.* 2013;6(7):433-9.
7. Maganga GD, Kombila LB, Boundenga L, Kinga ICM, Obame-Nkoghe J, Tchoffo H, *et al.* Diversity and prevalence of gastrointestinal parasites in farmed pigs in Southeast Gabon, Central Africa. *Vet World.* 2019;12(12):1888-96.

8. Permin A, Yelifari L, Bloch P, Steenhard N, Hansen NP, Nansen P. Parasites in cross-bred pigs in the Upper East Region of Ghana. *Vet Parasitol.* 1999;87(1):63-71.
9. Atawalna J, Attoh-Kotoku V, Folitse RD, Amenakpor C. Prevalence of Gastrointestinal Parasites among Pigs in the Ejisu Municipality of Ghana. *Sch J Agric Vet Sci.* 2016;3(1):33-6.
10. Nganga CJ, Karanja DN, Mutune MN. The prevalence of gastrointestinal helminth infections in pigs in Kenya. *Trop Anim Health Prod.* 2008;40(5):331-4.
11. Kagira JM, Kanyari PN, Githigia SM, Maingi N, Ng'ang'a JC, Gachohi JM. Risk factors associated with occurrence of nematodes in free range pigs in Busia District, Kenya. *Trop Anim Health Prod.* 2012;44(3):657-64.
12. Chilundo AG, Mukaratirwa S, Pondja A, Afonso S, Miambo R, Johansen MV. Prevalence and risk factors of *endo*- and ectoparasitic infections in smallholder pigs in Angónia district, Mozambique. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2017;7:1-8.
13. Ajayi JA, Arabs WL, Adeleye GA. Helminths and protozoa of pigs on the Jos Plateau, Nigeria: occurrence, age incidence and seasonal distribution. *Bull Anim Health Prod Afr.* 1988;36(1):47-54.
14. Salifu DA, Manga TB, Onyali IO. A survey of gastrointestinal parasites in pigs of the Plateau and Rivers States, Nigeria. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 1990;43(2):193-6.
15. Sowemimo OA, Asaolu SO, Adegoke FO, Ayanniyi OO. Epidemiological survey of gastrointestinal parasites of pigs in Ibadan, Southwest Nigeria. *J Public Health Epidemiol.* 2012;4(10):294-8.
16. Eyo JE, Echi PC, Atama CI, Onyishi GC, Ekeh FN, Ivoke N, *et al.* Incidence and Prevalence of Parasites in Exotic Suis-Large White (*Suidae*) Slaughtered In a Tropical Urban Abattoir. *Int J Parasitol Res.* 2014;6(1):132-5.
17. Karaye GP, Dogo AG, Iliyasu D, Madu HK. Prevalence of Swine Gastrointestinal Parasites in Four Selected Local Government Areas of Nasarawa State, Nigeria. *Int J Livest Res.* 2016;6(1):21-6.
18. Amadi AN, Ubiaru PC, Ugagu GM, Ibediugha BN, Obeagu IA, Njikeonye A. Preliminary study on the prevalence of gastrointestinal parasites of pigs managed and slaughtered in Umuahia North Local Government Area of Abia State, Nigeria. *Anim Res Int.* 2018;15(2):3013-9.
19. Tumusiime M, Ntampaka P, Niragire F, Sindikubwabo T, Habineza F. Prevalence of Swine Gastrointestinal Parasites in Nyagatare District, Rwanda. *J Parasitol Res.* 2020;2020:8814136.
20. Nwafor IC, Roberts H, Fourie P. Prevalence of gastrointestinal helminths and parasites in smallholder pigs reared in the central Free State Province. *Onderstepoort J Vet Res.* 2019;86(1):1687.
21. Esrony K, Kambarage DM, Mtambo MMA, Muhairwa AP, Kusiluka LJM. Helminthosis in local and cross-bred pigs in the Morogoro region of Tanzania. *Prev Vet Med.* 1997;32(1-2):41-6.
22. Ngowi HA, Kassuku AA, Maeda GEM, Boa ME, Willingham AL. A Slaughter Slab Survey for Extra-Intestinal Porcine Helminth Infections in Northern Tanzania. *Trop Anim Health Prod.* 2004;36(4):335-40.
23. Mellau BL, Nonga HE, Karimuribo ED. Slaughter stock abattoir survey of carcasses and organ/offal condemnations in Arusha region, northern Tanzania. *Trop Anim Health Prod.* 2011;43(4):857-64.
24. Mkupasi EM, Ngowi HA, Nonga HE. Prevalence of extra-intestinal porcine helminth infections and assessment of sanitary conditions of pig slaughter slabs in Dar es Salaam city, Tanzania. *Trop Anim Health Prod.* 2011;43(2):417-23.
25. Kabululu ML, Ngowi HA, Kimera SI, Lekule FP, Kimbi EC, Johansen MV. Risk factors for prevalence of pig parasitoses in Mbeya Region, Tanzania. *Vet Parasitol.* 2015;212(3-4):460-4.
26. Nissen S, Poulsen IH, Nejsum P, Olsen A, Roepstorff A, Rubaire-Akiiki C, *et al.* Prevalence of gastrointestinal nematodes in growing pigs in Kabale District in Uganda. *Trop Anim Health Prod.* 2011;43(3):567-72.

27. Roesel K, Dohoo I, Baumann M, Dione M, Grace D, Clausen PH. Prevalence and risk factors for gastrointestinal parasites in small-scale pig enterprises in Central and Eastern Uganda. *Parasitol Res.* 2017;116(1):335-45.
28. Makinde MO, Majok AA, Hill FWG. The prevalence of subclinical diseases in abattoir pigs in Zimbabwe. *Prev Vet Med.* 1993;15(1):19-24.
29. Marufu MC, Chanayiwa P, Chimonyo M, Bhebhe E. Prevalence of gastrointestinal nematodes in Mukota pigs in a communal area of Zimbabwe. *Afr J Agric Res.* 2008;3(2):91-5.
30. Gibbens JC, Gibbens NP, Fielding WJ. An abattoir survey of the prevalence of gastro-intestinal helminths and *Stephanurus dentatus* in pigs in Belize. *Trop Anim Health Prod.* 1989;21(3):197-204.
31. Fausto MC, Oliveira IC, Fausto GC, de Carvalho LM, Valente FL, Campos AK, *et al.* *Ascaris suum* in pigs of the Zona da Mata, Minas Gerais State, Brazil. *Braz J Vet Parasitol.* 2015;24(3):375-8.
32. Class C, Silveira R, Fialho P, Silva L, Lobão L, Amendoeira MR, *et al.* Family-Run Pig Farms: Research and Extension Activities for Parasite Control in a Municipality in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Pathogens.* 2022;11(9):971.
33. de Oliveira NTE, Carvalho PLO, Genova JL, Silveira FHR, Ogawa L, Cristofori EC, *et al.* Effect of endoparasites occurrence in sows from intensive production system. *Braz J Vet Parasitol.* 2019;28(4):722-7.
34. Gomes RA, Bonuti MR, Almeida KS, do Nascimento AA. Infection of heminths in wild boar (*Sus scrofa scrofa*) raised in captivity in São Paulo State, Brazil. *Cienc Rural.* 2005;35(3):625-8.
35. da Silva DS, Müller G. Parasitic helminths of the digestive system of wild boars bred in captivity. *Braz J Vet Parasitol.* 2013;22(3):433-6.
36. Bernardo TM, Dohoo IR. Swine ascariasis: impact on production and abattoir surveillance. *Acta Vet Scand.* 1988;84:265-7.
37. Martin LJ, Gibbs HC, Pullin JW. Gastrointestinal parasites of swine in Québec. I. An incidence survey. *Can Vet J.* 1974;15(3):72-6.
38. Polley LR, Mostert PE. *Ascaris suum* in Saskatchewan Pigs: An Abattoir Survey of Prevalence and Intensity of Infection. *Can Vet J.* 1980;21(11):307-9.
39. Wagner B, Polley L. *Ascaris suum* prevalence and intensity: an abattoir survey of market hogs in Saskatchewan. *Vet Parasitol.* 1997;73(3-4):309-13.
40. Torres P, Franjola R, Pérez J, Auad S, Hermosilla C, Flores L, *et al.* [Intestinal geohelminthosis in man and domestic animals in the riverside sections of the Valdivia River Basin, Chile]. *Bol Chil Parasitol.* 1995;50(3-4):57-66.
41. Hernandez AD, Li Y, Carr R, Major S. Intestinal roundworm infection in organic and alternative swine farms in the USA. *Vet Parasitol.* 2023;314:109856.
42. Gipson PS, Veatch JK, Matlack RS, Jones DP. Health Status of a Recently Discovered Population of Feral Swine in Kansas. *J Wildl Dis.* 1999;35(3):624-7.
43. de-la-Rosa-Arana JL, Ponce-Noguez JB, Reyes-Rodríguez NE, Vega-Sánchez V, Zepeda-Velázquez AP, Martínez-Juárez VM, *et al.* Helminths of the Wild Boar (*Sus scrofa*) from Units of Conservation Management and Sustainable Use of Wildlife Installed in the Eastern Economic Region of Mexico. *Animals (Basel).* 2021;11(1):98.
44. Luna LA, Kyvsgaard NC. Eight different species gastrointestinal parasites were identified in free roaming pigs in El Sauce - Leon. Nicaragua. *Rev Electron Vet.* 2005;6(10).
45. Dey TR, Dey AR, Begum N, Akther S, Barmon BC. Prevalence of end parasites of pig at Mymensingh, Bangladesh. *J Agric Vet Sci.* 2014;7(4):31-8.

46. Nur-E-Azam, Sen P, Tasneem M, Islam S, Rakib T, Alim A, *et al.* Occurrence of gastrointestinal parasitic infections in pig of Dinajpur district, Bangladesh. *Sci J Vet Adv.* 2015;4(8):57-66.
47. Nath TC, Eom KS, Choe S, Islam S, Sabuj SS, Saha E, *et al.* Insights to helminth infections in food and companion animals in Bangladesh: Occurrence and risk profiling. *Parasite Epidemiol Control.* 2022;17:e00245.
48. Inpankaew T, Murrell KD, Pinyopanuwat N, Chhoun C, Khov K, Sem T, *et al.* A survey for potentially zoonotic gastrointestinal parasites of dogs and pigs in Cambodia. *Acta Parasitol.* 2015;60(4):601-4.
49. Peng W, Zhou X, Cui X, Crompton DWT, Whitehead RR, Xiong J, *et al.* *Ascaris*, people and pigs in a rural community of Jiangxi Province, China. *Parasitology.* 1996;113(6):545-57.
50. Boes J, Willingham AL 3rd, Fuhui S, Xuguang H, Eriksen L, Nansen P, *et al.* Prevalence and distribution of pig helminths in the Dongting Lake Region (Hunan Province) of the People's Republic of China. *J Helminthol.* 2000;74(1):45-52.
51. Weng YB, Hu YJ, Li Y, Li BS, Lin RQ, Xie DH, *et al.* Survey of intestinal parasites in pigs from intensive farms in Guangdong Province, People's Republic of China. *Vet Parasitol.* 2005;127(3-4):333-6.
52. Lai M, Zhou RQ, Huang HC, Hu SJ. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasites in pigs in Chongqing, China. *Res Vet Sci.* 2011;91(3):121-4.
53. Zheng Y, Xie Y, Geldhof P, Vlaminck J, Ma G, Gasser RB, *et al.* High anti-*Ascaris* seroprevalence in fattening pigs in Sichuan, China, calls for improved management strategies. *Parasit Vectors.* 2020;13(1):60.
54. Du Hwan, J. Survey for Internal Parasites of Swine in Korea. *Korean J Vet Res.* 1975;15(2):309-14.
55. Min HK. [An Epidemiological Study On Zoonoses In Korea]. *Kisaengchunghak Chapchi.* 1981;19(1):60-75.
56. Ismail HA, Jeon HK, Yu YM, Do C, Lee YH. Intestinal Parasite Infections in Pigs and Beef Cattle in Rural Areas of Chungcheongnam-do, Korea. *Korean J Parasitol.* 2010;48(4):347-9.
57. Lee S, Alkathiri B, Kwak D, Lee SM, Lee WK, Byun JW, *et al.* Distribution of Gastrointestinal Parasitic Infection in Domestic Pigs in the Republic of Korea: Nationwide Survey from 2020-2021. *Korean J Parasitol.* 2022;60(3):207-11.
58. Laha R, Das M, Goswami A, Sen A, S Kumar, Kadirvel G. Epidemiology of Gastrointestinal Parasitism in Pigs in Subtropical Hill Zone of Meghalaya. *Indian J Hill Farming.* 2014;27(1):101-9.
59. Krishna Murthy CM, Ananda KJ, Adeppa J, Satheesha MG. Studies on gastrointestinal parasites of pigs in Shimoga region of Karnataka. *J Parasit Dis.* 2016;40(3):885-9.
60. Dadas S, Mishra S, Jawalagatti V, Gupta S, Vinay TS, Gudewar J. Prevalence of gastro-intestinal parasites in pigs (*Sus scrofa*) of Mumbai region. *Int J Sci Environ Technol.* 2016;5(2):822-6.
61. Singh AK, Das G, Nath S, Kumar S, Naresh R, Agrawal V. Prevalence of Gastrointestinal Parasitic Infections in Pig in and Around Jabalpur, Madhya Pradesh, India. *Indian Vet J.* 2017;94(3):17-9.
62. Kaur M, Singh BB, Sharma R, Gill JPS. Prevalence of gastro intestinal parasites in pigs in Punjab, India. *J Parasit Dis.* 2017;41(2):483-6.
63. Sharma D, Singh NK, Singh H, Rath SS. Copro-prevalence and risk factor assessment of gastrointestinal parasitism in Indian domestic pigs. *Helminthologia.* 2020;57(1):28-36.
64. Yadav AK, Tandon V. Nematode Parasite Infections of Domestic Pigs in a Sub-tropical and High-rainfall Area of India. *Vet Parasitol.* 1989;31(2):133-9.
65. Gaurat RP, Gatne ML. Prevalence of Helminth Parasites in domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) in Mumbai: An abattoir survey. *J Bombay Vet College.* 2005;13(1-2):100-2.

66. Kalai K, Nehete RS, Ganguly S, Ganguli M, Dhanalakshmi S, Mukhopadhyay SK. Investigation of parasitic and bacterial diseases in pigs with analysis of hematological and serum biochemical profile. *J Parasit Dis.* 2012;36(1):129-34.
67. Nugroho W, Cargill CF, Putra IM, Kirkwood RN, Trott DJ, Salasia SIO, *et al.* Investigations of selected pathogens among village pigs in Central Papua, Indonesia. *Trop Anim Health Prod.* 2016;48(1):29-36.
68. Dodangeh S, Azami D, Daryani A, Gholami S, Sharif M, Mobedi I, *et al.* Parasitic Helminths in Wild Boars (*Sus scrofa*) in Mazandaran Province, Northern Iran. *Iran J Parasitol.* 2018;13(3):416-22.
69. Matsubayashi M, Kita T, Narushima T, Kimata I, Tani H, Sasai K, *et al.* Coprological Survey of Parasitic Infections in Pigs and Cattle in Slaughterhouse in Osaka, Japan. *J Vet Med Sci.* 2009;71(8):1079-83.
70. Sato H, Suzuki K, Yokoyama M. Visceral helminths of wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) in Japan, with special reference to a new species of the genus *Morgascaridia* Inglis, 1958 (Nematoda: Schneidernematidae). *J Helminthol.* 2008;82(2):159-68.
71. Edmund CCM, Sani RA, Goh YM, Maizatul-Akmal M. Gastrointestinal parasites in pigs: prevalence and diagnosis. *J Vet Malaysia.* 2005;17(1):33-6.
72. Chaisiri K, Aueawiboonsri S, Kusolsuk T, Dekumyoy P, Sanguankiat S, Homsuwan N, *et al.* Gastrointestinal helminths and *Taenia* spp. in parenteral tissues of free-roaming pigs (*Sus scrofa indicus*) from hill-tribe village at the western border of Thailand. *Trop Biomed.* 2017;34(2):464-70.
73. Cardoso-Amaral A, da Costa-Freitas J. How common is *Ascaris suum* in pigs in Timor Leste? *Veritas.* 2015;3(2):39-52.
74. Epe C, Coati N, Schnieder T. [Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2004;111(6):243-7.
75. Raue K, Heuer L, Böhm C, Wolken S, Epe C, Strube C. 10-year parasitological examination results (2003 to 2012) of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, rabbits and hedgehogs. *Parasitol Res.* 2017;116(12):3315-30.
76. Barutzki D, Schoierer R, Gothe R. [Helminth infections in wild boars in enclosures in southern Germany: species spectrum and infection frequency]. *Tierarztl Prax.* 1990;18(5):529-34.
77. Joachim A, Winkler C, Ruczizka U, Ladinig A, Koch M, Tichy A, *et al.* Comparison of different detection methods for *Ascaris suum* infection on Austrian swine farms. *Porcine Health Manag.* 2021;7(1):57.
78. Vercruyse J, Hoof D, van Bie S. Study of the prevalence of white spots of the liver in pigs in Belgium and its relationship to management practices and anthelmintic treatment. *Vlaams Diergeneesk Tijdschr.* 1997;66:28-30.
79. Panayotova-Pencheva M, Dakova V. Studies on the gastrointestinal and lung parasite fauna of wild boars (*Sus scrofa scrofa* L.) from Bulgaria. *Ann Parasitol.* 2018;64(4):379-84.
80. Roepstorff A, Jorsal SE. Prevalence of Helminth Infections in Swine in Denmark. *Vet Parasitol.* 1989;33(3-4):231-9.
81. Dangolla A, Willeberg P, Bjørn H, Roepstorff A. Associations of *Ascaris suum* and *Oesophagostomum* spp. infections of sows with management factors in 83 Danish sow herds. *Prev Vet Med.* 1996;27(3-4):197-209.
82. Roepstorff A. Natural *Ascaris suum* infections in swine diagnosed by coprological and serological (ELISA) methods. *Parasitol Res.* 1998;84(7):537-43.
83. Haugegaard J. Prevalence of nematodes in Danish industrialized sow farms with loose housed sows in dynamic groups. *Vet Parasitol.* 2010;168(1-2):156-9.

84. Petersen HH, Takeuchi-Storm N, Enemark HL, Nielsen ST, Larsen G, Chriél M. Surveillance of important bacterial and parasitic infections in Danish wild boars (*Sus scrofa*). *Acta Vet Scand.* 2020;62(1):41.
85. Ibáñez-Sanchis C, Blasco-Mateu V. Prevalencia de ascariosis en ganado porcino en un matadero de la Comunidad Valenciana. *Nereis.* 2020;12:167-84.
86. García-Vallejo TB. Endoparasitosis del porcino ibérico en Extremadura (España): epidemiología y control [Tesis]. Cáceres: Universidad de Extremadura: 1999.
87. Frontera-Carión EM. Repercusiones orgánicas de la infección experimental por *Ascaris suum* en el cerdo ibérico [Tesis]. Cáceres: Universidad de Extremadura: 2000.
88. Martínez-Pérez JM, Vandekerckhove E, Vlaminck J, Geldhof P, Martínez-Valladares M. Serological detection of *Ascaris suum* at fattening pig farms is linked with performance and management indices. *Vet Parasitol.* 2017;248:33-8.
89. Datos propios no publicados.
90. de-la-Muela N, Hernández-de-Luján S, Ferre I. Helminths of Wild Boar in Spain. *J Wildl Dis.* 2001;37(4):840-3.
91. Vázquez-Rodríguez J. Evaluación del Estado Sanitario del Jabalí en la Sierra de Aracena (Huelva) y sus Factores de Riesgo Asociados [Tesis]. Murcia: Universidad de Murcia: 2015.
92. Järvis T, Kapel Ch, Moks E, Talvik H, Mägi E. Helminths of wild boar in the isolated population close to the northern border of its habitat area. *Vet Parasitol.* 2007;150(4):366-9.
93. Delsart M, Fablet C, Rose N, Répérant JM, Blaga R, Dufour B, *et al.* Descriptive epidemiology of the main internal parasites on alternative pig farms in France. *J Parasitol.* 2022;108(4):306-21.
94. Fernandez-de-Mera IG, Gortazar C, Vicente J, Höfle U, Fierro Y. Wild boar helminths: risks in animal translocations. *Vet Parasitol.* 2003;115(4):335-41.
95. Symeonidou I, Tassis P, Gelasakis AI, Tzika ED, Papadopoulos E. Prevalence and Risk Factors of Intestinal Parasite Infections in Greek Swine Farrow-To-Finish Farms. *Pathogens.* 2020;9(7):556.
96. Rambozzi L, Burzio G, Martano G, Panero F. A slaughter survey for *Ascaris suum* infection in North-Western Italy. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini.* 2006;32:311-6.
97. Vismarra A, Lenti A, Genchi M, Kramer L, Geldhof P. Seroprevalence of *Ascaris suum* compared to milk spot prevalence at slaughter in Italian fattening pigs. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2023;37:100828.
98. Castagna F, Musella V, Esposito L, Poerio A, Rinaldi L, Bosco A, *et al.* Helminths of Wild Boar (*Sus scrofa*) in the Calabrian Region of Southern Italy. *J Wildl Dis.* 2019;55(2):416-20.
99. Eijck IAJM, Borgsteede FHM. A Survey of Gastrointestinal Pig Parasites on Free-range, Organic and Conventional Pig Farms in The Netherlands. *Vet Res Commun.* 2005;29:407-14.
100. Roepstorff A, Nilsson O, O'Callaghan CJ, Oksanen A, Gjerde B, Richter SH, *et al.* Intestinal parasites in swine in the Nordic countries: multilevel modelling of *Ascaris suum* infections in relation to production factors. *Parasitology.* 1999;119(5):521-34.
101. Kochanowski M, Karamon J, Dąbrowska J, Dors A, Czyżewska-Dors E, Cencek T. Occurrence of intestinal parasites in pigs in Poland - the influence of factors related to the production system. *J Vet Res.* 2017;61(4):459-66.
102. Sanchez-Vazquez MJ, Smith RP, Kang S, Lewis F, Nielen M, Gunn GJ, *et al.* Identification of factors influencing the occurrence of milk spot livers in slaughtered pigs: A novel approach to understanding *Ascaris suum* epidemiology in British farmed pigs. *Vet Parasitol.* 2010;173(3-4):271-9.

103. Sanchez-Vazquez MJ, Nielen M, Gunn GJ, Lewis FI. National monitoring of *Ascaris suum* related liver pathologies in English abattoirs: A time-series analysis, 2005-2010. *Vet Parasitol.* 2012;184(1):83-7.
104. Băieș MH, Boros Z, Gherman CM, Spînu M, Mathe A, Pataky S, *et al.* Prevalence of Swine Gastrointestinal Parasites in Two Free-Range Farms from Nord-West Region of Romania. *Pathogens.* 2022;11(9):954.
105. Belov YA, Tabakaeva TV, Pankratov DV, Shchelkanov EM, Surovyi AL, Popov IA, *et al.* Endoparasites of wild boars (*Sus scrofa*) in Primorsky Krai, Russia. *Helminthologia.* 2022;59(2):165-9.
106. Ilić T, Becskei Z, Tasić A, Dimitrijević S. Follow-up study of prevalence and control of ascariasis in swine populations in Serbia. *Acta Parasitol.* 2013;58(3):278-83.
107. Tamara I, Nataša M, Sanda D, Danica B, Katarina N, Bojan G, *et al.* The Prevalence and Degree of Endoparasitic Infections in Wild Boars Using the Semi-quantitative Fecal Egg Count Method. *Acta Parasitol.* 2021;66(1):104-15.
108. Pettersson E, Sjölund M, Dórea FC, Lind EO, Grandi G, Jacobson M, *et al.* Gastrointestinal parasites in Swedish pigs: Prevalence and associated risk factors for infection in herds where animal welfare standards are improved. *Vet Parasitol.* 2021;295:109459.
109. Schubnell F, von Ah S, Graage R, Sydler T, Sidler X, Hadorn D, *et al.* Occurrence, clinical involvement and zoonotic potential of endoparasites infecting Swiss pigs. *Parasitol Int.* 2016;65(6):618-24.
110. Spieler N, Schnyder M. Lungworms (*Metastrongylus* spp.) and intestinal parasitic stages of two separated Swiss wild boar populations north and south of the Alps: Similar parasite spectrum with regional idiosyncrasies. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2021;14:202-10.
111. Uysal HK, Boral O, Metiner K, Ilgaz A. Investigation of Intestinal Parasites in Pig Feces That Are also Human Pathogens. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2009;33(2):218-21.
112. Mercy AR, de Chaneet G, Emms Y. Survey of internal parasites in Western Australian pig herds. 1. Prevalence. *Aust Vet J.* 1989;66(1):4-6.

Anexo II

Estrategias de búsqueda diseñadas para cada una de las bases de datos empleadas (PubMed y Web of Science Core Collection) con el objetivo de obtener las fuentes de evidencia a analizar en la revisión de alcance recogida en la presente Tesis Doctoral. La búsqueda en ambas bases de datos se realizó el 5 de mayo de 2021.

Estrategia de búsqueda para PubMed:

- #1 "parasites"[MeSH Terms] OR "parasite*"[All Fields] OR "parasiti*"[All Fields]
- #2 "helminths"[MeSH Terms] OR "helminth*"[All Fields]
- #3 "worm*"[All Fields]
- #4 "nematoda"[MeSH Terms] OR "nematod*"[All Fields]
- #5 "platyhelminths"[MeSH Terms] OR "platyhelminth*"[All Fields]
- #6 "trematoda"[MeSH Terms] OR "trematod*"[All Fields]
- #7 "cestoda"[MeSH Terms] OR "cestod*"[All Fields]
- #8 #1 OR #2 OR #3 OR #4 OR #5 OR #6 OR #7
- #9 "hemostasis"[MeSH Terms] OR "hemosta*"[All Fields] OR "haemosta*"[All Fields]
- #10 "blood coagulation"[MeSH Terms] OR "coagulation"[All Fields]
- #11 "blood platelets"[MeSH Terms] OR "platelet*"[All Fields]
- #12 "von willebrand factor"[MeSH Terms] OR "von willebrand factor"[All Fields]
- #13 "thromboplastin"[MeSH Terms] OR "tissue factor"[All Fields]
- #14 "factor v"[MeSH Terms] OR "factor v"[All Fields]
- #15 "factor vii"[MeSH Terms] OR "factor vii"[All Fields]
- #16 "factor viii"[MeSH Terms] OR "factor viii"[All Fields]
- #17 "factor ix"[MeSH Terms] OR "factor ix"[All Fields]
- #18 "factor x"[MeSH Terms] OR "factor x"[All Fields]
- #19 "factor xi"[MeSH Terms] OR "factor xi"[All Fields]
- #20 "factor xii"[MeSH Terms] OR "factor xii"[All Fields]
- #21 "factor xiii"[MeSH Terms] OR "factor xiii"[All Fields]
- #22 "prothrombin"[MeSH Terms] OR "prothrombin*"[All Fields]
- #23 "thrombin"[MeSH Terms] OR "thrombin*"[All Fields]
- #24 "antithrombin iii"[MeSH Terms] OR "antithrombin"[All Fields]
- #25 "protein c"[MeSH Terms] OR "protein c"[All Fields]
- #26 "fibrinogen"[MeSH Terms] OR "fibrin"[MeSH Terms] OR "fibrinolysis"[MeSH Terms] OR "fibrinolysin"[MeSH Terms] OR "fibrin*"[All Fields]
- #27 "plasminogen"[MeSH Terms] OR "tissue plasminogen activator"[MeSH Terms] OR "urokinase type plasminogen activator"[MeSH Terms] OR "urokinase"[All Fields] OR "plasminogen activator inhibitor 1"[MeSH Terms] OR "plasminogen activator inhibitor 2"[MeSH Terms] OR "plasmin*"[All Fields]
- #28 "alpha 2 antiplasmin"[MeSH Terms] OR "antiplasmin"[All Fields]

#29 #9 OR #10 OR #11 OR #12 OR #13 OR #14 OR #15 OR #16 OR #17 OR #18 OR #19 OR #20 OR
#21 OR #22 OR #23 OR #24 OR #25 OR #26 OR #27 OR #28

#30 #8 AND #29

#31 #30 AND 1900/01/01:2019/12/31[Date - Publication]

Estrategia de búsqueda para Web of Science Core Collection:

#1 ALL=(parasite* OR parasiti*)

#2 ALL=(helminth* OR worm* OR nematod* OR platyhelminth* OR trematod*OR cestod*)

#3 #1 OR #2

#4 ALL=(hemosta* OR haemosta*)

#5 ALL=("coagulation" OR platelet* OR "von willebrand factor" OR "tissue factor" OR "factor v" OR
"factor vii" OR "factor viii" OR "factor ix" OR "factor x" OR "factor xi" OR "factor xii" OR "factor xiii"
OR prothrombin* OR thrombin* OR "antithrombin" OR "protein c" OR fibrin* OR plasmin* OR
"urokinase" OR "antiplasmin")

#6 #4 OR #5

#7 #3 AND #6

Indexes=SCI-EXPANDED, ESCI Timespan=1900-2019

Anexo III

Protocolo estandarizado diseñado para extraer la información relevante para la revisión de alcance de las fuentes de evidencia seleccionadas.

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO (<i>ARTICLE INFORMATION</i>)	Número de documento (<i>Document number</i>)	Número de artículo analizado. Serán ordenados de menor a mayor desde el más antiguo hasta el más reciente, según la fecha de publicación
	Número de acceso (<i>Accession number</i>)	Identificador del artículo analizado correspondiente a la base de datos de la que ha sido extraído: PMID (PubMed) o WOS: número de acceso (WOS CC)
	Referencia bibliográfica (<i>Bibliographic reference</i>)	Referencia bibliográfica abreviada del artículo analizado
	Año de publicación (<i>Year of publication</i>)	Año en el que se publicó el artículo analizado
INFORMACIÓN SOBRE EL PARÁSITO (<i>PARASITE INFORMATION</i>)	Especie (<i>Species</i>)	Especie de helminto parásito responsable de la interacción descrita
	Estadio (<i>Stage</i>)	Estadio del parásito empleado para estudiar la interacción descrita. Se definirá como <i>ADULT</i> , <i>EGG</i> o <i>LARVA</i> . En el último caso, se indicará entre paréntesis el estadio larvario concreto. Si en el artículo se describen experimentos que revelen la localización de la molécula responsable de la interacción en estadios parasitarios adicionales a aquel en el que se describe la interacción, estos se escribirán a continuación del primero separados por una barra (/)
	Material parasitario (<i>Parasitic material</i>)	Tipo de material parasitario empleado para estudiar la interacción descrita. Se describirá como <i>EXTRACT</i> , <i>NATIVE PROTEIN</i> , <i>PROTEIN FRACTION</i> , <i>RECOMBINANT PROTEIN</i> o <i>WHOLE PARASITE</i>
	Descripción del material parasitario (<i>Description of the parasitic material</i>)	Descripción del material parasitario empleado para estudiar la interacción descrita. Se definirá con el nombre del material parasitario indicado en el artículo
INFORMACIÓN SOBRE LA INTERACCIÓN PARÁSITO- HOSPEDADOR (<i>HOST-PARASITE INTERACTION INFORMATION</i>)	Compartimento del material parasitario (<i>Compartment of the parasitic material</i>)	Compartimento en el que se describe la interacción. Se definirá como <i>EXCRETORY/SECRETORY</i> , <i>SOMATIC</i> , <i>SURFACE</i> o <i>WHOLE PARASITE</i> . Si en el artículo se describen experimentos que revelen la localización de la molécula responsable de la interacción en compartimentos adicionales a aquel en el que se describe la interacción, estos se escribirán a continuación del primero separados por una barra (/)
	Tipo de interacción (<i>Type of interaction</i>)	Efecto que el material parasitario empleado para estudiar la interacción tiene sobre el componente del sistema homeostático del hospedador analizado. Se definirá de la misma forma en la que esté descrita en el artículo
	Componente del sistema homeostático del hospedador responsable de la interacción (<i>Interacting component of the host haemostatic system</i>)	Molécula o etapa del sistema homeostático del hospedador con la que interacciona el material parasitario empleado para estudiarla. Se definirá de la misma forma en la que esté descrita en el artículo
	Técnica empleada para estudiar la interacción (<i>Interaction study technique</i>)	Técnica/s utilizada/s para demostrar la interacción entre el material parasitario empleado y el componente del sistema homeostático del hospedador analizado. Se definirá de la misma forma en la que esté descrita en el artículo

Molécula parasitaria identificada como responsable de la interacción (<i>Interacting parasite molecule identified</i>)	En el caso de extractos complejos, fracciones proteicas y parásitos completos, molécula/s identificada/s en estos materiales parasitarios como responsable/s de la interacción con el sistema hemostático del hospedador. Se definirá de la misma forma en la que esté descrita en el artículo
Técnica de identificación (<i>Identification technique</i>)	En el caso de extractos complejos, fracciones proteicas y parásitos completos, técnica/s empleada/s para identificar la/s molécula/s responsable/s de la interacción con el sistema hemostático del hospedador en estos materiales parasitarios. Se definirá de la misma forma en la que esté descrita en el artículo
Ruta de interacción del sistema hemostático del hospedador (<i>Interacting pathway of the host haemostatic system</i>)	Ruta del sistema hemostático del hospedador con la que interacciona el material parasitario empleado para estudiarla. Se definirá como <i>COAGULATION</i> o <i>FIBRINOLYSIS</i>
Efecto atribuido a la interacción sobre la formación o disolución de coágulos sanguíneos en el hospedador (<i>Effect on blood clot formation/dissolution in the host</i>)	Efecto atribuido por los autores de la publicación a la interacción descrita en relación a la formación o disolución de coágulos sanguíneos en el hospedador. Se definirá como <i>ANTICOAGULANT</i> , <i>PRO-COAGULANT</i> , <i>ANTI-FIBRINOLYTIC</i> o <i>PRO-FIBRINOLYTIC</i>
Proceso biológico atribuido a la interacción (<i>Biological process attributed to the interaction</i>)	Proceso/s biológico/s en el/los que la interacción podría participar, según los autores de la publicación. Se definirá como <i>COUNTERBALANCE</i> , <i>ESTABLISHMENT</i> , <i>EVASION</i> , <i>INVASION</i> , <i>NUTRITION</i> , <i>MIGRATION</i> , <i>MODULATION</i> , <i>PATHOGENESIS</i> o <i>SURVIVAL</i> . Se indicará entre paréntesis el proceso concreto descrito en el artículo
Validación del proceso biológico atribuido (<i>Validation of the attributed process</i>)	Validación experimental de la participación de la interacción en el/los proceso/s biológico/s atribuido/s por los autores de la publicación. Se definirá como <i>YES</i> o <i>NO</i> . Se indicará entre paréntesis el proceso biológico concreto demostrado

Los términos que aparecen en inglés corresponden a los empleados en el Anexo V.

Anexo IV

Referencias bibliográficas completas de las fuentes de evidencia seleccionadas en la revisión de alcance.

1. Thorson RE. The effect of extracts of the amphidial glands, excretory glands, and esophagus of adults of *Ancylostoma caninum* on the coagulation of dog's blood. *J Parasitol.* 1956;42(1):26-30.
2. Devi CS, Murthy DP, Devi SL, Reddy CRRM. Fibrinolytic activity of infective larvae of *Dracunculus medinensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1971;20(1):101-3.
3. Spellman GG Jr, Nossel HL. Anticoagulant activity of dog hookworm. *Am J Physiol.* 1971;220(4):922-7.
4. Tsang VCW, Hubbard WJ, Damian RT. Coagulation factor XIIa (activated Hageman factor) inhibitor from adult *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.* 1977;26(2):243-7.
5. Hammerberg B, Dangler C, Williams JF. *Taenia taeniaeformis*: chemical composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascades. *J Parasitol.* 1980;66(4):569-76.
6. Greene CE, Prestwood K, Tsang VC. Effect of *Haemonchus contortus* Extracts on Coagulation of Ovine Plasma. *J Parasitol.* 1981;67(5):730-1.
7. Crawford GPM, Howse DJ, Grove DI. Inhibition of human blood clotting by extracts of *Ascaris suum*. *J Parasitol.* 1982;68(6):1044-7.
8. Hotez PJ, Cerami A. Secretion of a proteolytic anticoagulant by *Ancylostoma* hookworms. *J Exp Med.* 1983;157(5):1594-603.
9. McConnell LA, Leid RW. Aggregation of Equine Platelets by *Onchocerca cervicalis* Collagen. *Am J Pathol.* 1983;110(3):290-6.
10. Boreham PFL. Activation *in vitro* of some biological systems by extracts of adult worms and microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *J Helminthol.* 1984;58(3):207-12.
11. Carroll SM, Howse DJ, Grove DI. The Anticoagulant Effects of the Hookworm, *Ancylostoma ceylanicum*: Observations on Human and Dog Blood *In Vitro* and Infected Dogs *In Vivo*. *Thromb Haemost.* 1984;51(2):222-7.
12. Tamashiro WK, Rao M, Scott AL. Proteolytic cleavage of IgG and other protein substrates by *Dirofilaria immitis* microfilarial enzymes. *J Parasitol.* 1987;73(1):149-54.
13. Malla N, Sofi BA, Ganguly NK, Mahajan RC. In vitro effect of larval stages of *Ascaris lumbricoides* on human blood clotting. *J Helminthol.* 1991;65:133-40.
14. Liu LX, Weller PF. Intravascular Filarial Parasites Inhibit Platelet Aggregation. Role of Parasite-derived Prostanoids. *J Clin Invest.* 1992;89:1113-20.
15. Cappello M, Clyne LP, McPhedran P, Hotez PJ. *Ancylostoma* Factor Xa Inhibitor: Partial Purification and Its Identification as a Major Hookworm-Derived Anticoagulant *In Vitro*. *J Infect Dis.* 1993;167(6):1474-7.
16. Kadipasaoglu KA, Bilge FH, Baier RE. Determination of the role of cuticular carbohydrates in the hemocompatibility of *Dirofilaria immitis* (Nematoda). *J Biomed Mater Res.* 1993;27:207-16.
17. Knox DP, Redmond DL, Jones DG. Characterization of proteinases in extracts of adult *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal nematode. *Parasitology.* 1993;106(4):395-404.
18. Brown A, Burleigh JM, Billett EE, Pritchard DI. An initial characterization of the proteolytic enzymes secreted by the adult stage of the human hookworm *Necator americanus*. *Parasitology.* 1995;110(5):555-63.

19. Cappello M, Vlasuk GP, Bergum PW, Huang S, Hotez PJ. *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: A hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(13):6152-6.
20. Dowd AJ, McGonigle S, Dalton JP. *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase cleaves fibrinogen and produces a novel type of fibrin clot. Eur J Biochem. 1995;232(1):241-6.
21. Rhoads ML, Fetterer RH. Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like cysteine proteases by *Haemonchus contortus*. J Parasitol. 1995;81(4):505-12.
22. Todorova VK, Knox DP, Kennedy MW. Proteinases in the excretory/secretory products (ES) of adult *Trichinella spiralis*. Parasitology. 1995;111(2):201-8.
23. Young CJ, McKeand JB, Knox DP. Proteinases released *in vitro* by the parasitic stages of *Teladorsagia circumcincta*, an ovine abomasal nematode. Parasitology. 1995;110:465-71.
24. Cappello M, Hawdon JM, Jones BF, Kennedy WP, Hotez PJ. *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: cloning by PCR and expression of soluble, active protein in *E. coli*. Mol Biochem Parasitol. 1996;80:113-7.
25. Furnidge BA, Horn LA, Pritchard DI. The anti-haemostatic strategies of the human hookworm *Necator americanus*. Parasitology. 1996;112(1):81-7.
26. Gamble HR, Fetterer RH, Mansfield LS. Developmentally regulated zinc metalloproteinases from third- and fourth-stage larvae of the ovine nematode *Haemonchus contortus*. J Parasitol. 1996;82(2):197-202.
27. Perteguer MJ, Raposo R, Cuéllar C. *In Vitro* Study on the Effect of Larval Excretory/Secretory Products and Crude Extracts from *Anisakis simplex* on Blood Coagulation. Int J Parasitol. 1996;26(1):105-8.
28. Stanssens P, Bergum PW, Gansemans Y, Jespers L, Laroche Y, Huang S, *et al.* Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93(5):2149-54.
29. Dowd AJ, Tort J, Roche L, Ryan T, Dalton JP. Isolation of a cDNA encoding *Fasciola hepatica* cathepsin L2 and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biochem Parasitol. 1997;88(1-2):163-74.
30. MacLennan K, Gallagher MP, Knox DP. Stage-specific Serine and Metallo-proteinase Release by Adult and Larval *Trichostrongylus vitrinus*. Int J Parasitol. 1997;27(9):1031-6.
31. Chadderdon RC, Cappello M. The Hookworm Platelet Inhibitor: Functional Blockade of Integrins GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) and GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$) Inhibits Platelet Aggregation and Adhesion In Vitro. J Infect Dis. 1999;179(5):1235-41.
32. Vázquez-López C, de Armas-Serra C, Giménez-Pardo C, Rodríguez-Caabeiro F. Proteolytic activity of the *Gymnorhynchus gigas* plerocercoid: purification and properties of a collagenase from the crude extract. Parasitol Res. 1999;85:64-70.
33. Geldhof P, Claerebout E, Knox DP, Agneessens J, Vercruyse J. Proteinases released *in vitro* by the parasitic stages of the bovine abomasal nematode *Ostertagia ostertagi*. Parasitology. 2000;121:639-47.
34. Gomez-Escobar N, Gregory WF, Maizels RM. Identification of *tgh-2*, a Filarial Nematode Homolog of *Caenorhabditis elegans daf-7* and Human Transforming Growth Factor β , Expressed in Microfilarial and Adult Stages of *Brugia malayi*. Infect Immun. 2000;68(11):6402-10.
35. Ros-Moreno RM, Vázquez-López C, Giménez-Pardo C, de Armas-Serra C, Rodríguez-Caabeiro F. A study of proteases throughout the life cycle of *Trichinella spiralis*. Folia Parasitol (Praha). 2000;47:49-54.

36. Buddai SK, Touloukhouva L, Bergum PW, Vlasuk GP, Krishnaswamy S. Nematode Anticoagulant Protein c2 Reveals a Site on Factor Xa That Is Important for Macromolecular Substrate Binding to Human Prothrombinase. *J Biol Chem.* 2002;277(29):26689-98.
37. Crab A, Noppe W, Pelicaen C, Van Hoorelbeke K, Deckmyn H. The Parasitic Hematophagous Worm *Haemonchus contortus* Inhibits Human Platelet Aggregation and Adhesion: Partial Purification of a Platelet Inhibitor. *Thromb Haemost.* 2002;87:899-904.
38. Harrison LM, Nerlinger A, Bungiro RD, Córdova JL, Kuzmic P, Cappello M. Molecular Characterization of *Ancylostoma* Inhibitors of Coagulation Factor Xa. Hookworm anticoagulant activity *in vitro* predicts parasite bloodfeeding *in vivo*. *J Biol Chem.* 2002;277(8):6223-9.
39. Doenhoff MJ, Stanley RG, Pryce D, Curtis RC, Parry H, Griffiths K, *et al.* Identification of a fibrinolytic enzyme in *Schistosoma mansoni* eggs and modulated blood fibrinogen metabolism in *S. mansoni*-infected mice. *Parasitology.* 2003;126(3):231-4.
40. Joachim A, Ali SF, Dauschies A. *Fasciola hepatica* alters coagulation parameters in sheep plasma *in vivo* and *in vitro*. *Parasitol Res.* 2003;89:53-8.
41. Jolodar A, Fischer P, Bergmann S, Büttner DW, Hammerschmidt S, Brattig NW. Molecular cloning of an α -enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1627(2-3):111-20.
42. Williamson AL, Brindley PJ, Loukas A. Hookworm cathepsin D aspartic proteases: contributing roles in the host-specific degradation of serum proteins and skin macromolecules. *Parasitology.* 2003;126(2):179-85.
43. 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.
44. Mieszczanek J, Harrison LM, Cappello M. *Ancylostoma ceylanicum* anticoagulant peptide-1: role of the predicted reactive site amino acid in mediating inhibition of coagulation factors Xa and VIIa. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;137(1):151-9.
45. Mieszczanek J, Harrison LM, Vlasuk GP, Cappello M. Anticoagulant peptides from *Ancylostoma caninum* are immunologically distinct and localize to separate structures within the adult hookworm. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;133(2):319-23.
46. Erttmann KD, Kleensang A, Schneider E, Hammerschmidt S, Büttner DW, Gallin M. Cloning, characterization and DNA immunization of an *Onchocerca volvulus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Ov-GAPDH). *Biochim Biophys Acta.* 2005;1741(1-2):85-94.
47. Suchitra S, Joshi P. Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulina suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1722(3):293-303.
48. Barbosa AP, Campos DM, Semerene AR, Teixeira AR, Santana JM. *Lagochilascaris minor* third-stage larvae secrete metalloproteases with specificity for fibrinogen and native collagen. *Microbes Infect.* 2006;8(12-13):2725-32.
49. Lin YL, He S. Sm22.6 antigen is an inhibitor to human thrombin. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;147(1):95-100.
50. Muleke CI, Ruofeng Y, Lixin X, Yanming S, Xiangrui L. Characterization of HC58cDNA, a putative cysteine protease from the parasite *Haemonchus contortus*. *J Vet Sci.* 2006;7(3):249-55.
51. Wang K, Guo Y, Li K, Lu Y, Zhang Y, Sun S, *et al.* Molecular characterization and anticoagulant activity of a novel annexin derived from the *Taenia solium*. *Acta Trop.* 2006;99(2-3):165-72.
52. Marcilla A, Pérez-García A, Espert A, Bernal D, Muñoz-Antolí C, Esteban JG, *et al.* *Echinostoma caproni*: identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. *Exp Parasitol.* 2007;117(1):57-64.

53. Merckelbach A, Ruppel A. Biochemical properties of an intracellular serpin from *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;156(1):84-8.
54. Ramajo-Hernández A, Pérez-Sánchez R, Ramajo-Martín V, Oleaga A. *Schistosoma bovis*: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Exp Parasitol*. 2007;115(1):83-91.
55. Wu YP, Lenting PJ, Tielens AG, de Groot PG, van Hellemond JJ. Differential platelet adhesion to distinct life-cycle stages of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *J Thromb Haemost*. 2007;5(10):2146-8.
56. Zhang Y, Wang KH, Guo YJ, Lu YM, Yan HL, Song YL, *et al*. Annexin B1 from *Taenia solium* metacestodes is a newly characterized member of the annexin family. *Biol Chem*. 2007;388(6):601-10.
57. Geldhof P, Knox D. The intestinal contortin structure in *Haemonchus contortus*: an immobilised anticoagulant? *Int J Parasitol*. 2008;38(13):1579-88.
58. Gan W, Deng L, Yang C, He Q, Hu J, Yin H, *et al*. An anticoagulant peptide from the human hookworm, *Ancylostoma duodenale* that inhibits coagulation factors Xa and XIa. *FEBS Lett*. 2009;583(12):1976-80.
59. Hwang JH, Lee WG, Na BK, Lee HW, Cho SH, Kim TS. Identification and characterization of a serine protease inhibitor of *Paragonimus westermani*. *Parasitol Res*. 2009;104(3):495-501.
60. de la Torre-Escudero E, Manzano-Román R, Pérez-Sánchez R, Siles-Lucas M, Oleaga A. Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Vet Parasitol*. 2010;173(1-2):76-84.
61. Deng L, He Q, Kang T, Yin H, Jin X, Li H, *et al*. Identification of an anticoagulant peptide that inhibits both fXIa and fVIIa/tissue factor from the blood-feeding nematode *Ancylostoma caninum*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;392(2):155-9.
62. Lu YM, Wang N, Wang JJ, Wang KH, Sun SH. Expression, purification, and characterization of a novel Ca(2+)- and phospholipid-binding protein annexin B2. *Mol Biol Rep*. 2010;37(3):1591-6.
63. 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.
64. Yi D, Xu L, Yan R, Li X. *Haemonchus contortus*: cloning and characterization of serpin. *Exp Parasitol*. 2010;125(4):363-70.
65. Jiang D, Zhan B, Mayor RS, Gillespie P, Keegan B, Bottazzi ME, *et al*. Ac-AP-12, a novel factor Xa anticoagulant peptide from the esophageal glands of adult *Ancylostoma caninum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2011;177(1):42-8.
66. 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.
67. de la Torre-Escudero E, Manzano-Román R, Siles-Lucas M, Pérez-Sánchez R, Moyano JC, Barrera I, *et al*. Molecular and functional characterization of a *Schistosoma bovis* annexin: fibrinolytic and anticoagulant activity. *Vet Parasitol*. 2012;184(1):25-36.
68. 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.
69. Tong Y, Zhou J, Mao M, Gao J, Yuan L. Generation of bioactive recombinant *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide c2. *Protein Expr Purif*. 2012;81(1):49-54.

70. 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.
71. Lei H, Tian Y, Chen W, Wang X, Li X, Mao Q, *et al.* The biochemical and immunological characterization of two serpins from *Clonorchis sinensis*. *Mol Biol Rep.* 2013;40(6):3977-85.
72. deWalick S, Hensbergen PJ, Bexkens ML, Grosserichter-Wagener C, Hokke CH, Deelder AM, *et al.* Binding of von Willebrand factor and plasma proteins to the eggshell of *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 2014;44(5):263-8.
73. 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.
74. 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.
75. Figueiredo BC, Da'dara AA, Oliveira SC, Skelly PJ. Schistosomes Enhance Plasminogen Activation: The Role of Tegumental Enolase. *PLoS Pathog.* 2015;11(12):e1005335.
76. 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? *Parasit Vectors.* 2015;8:194.
77. 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.
78. 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.
79. Li WH, Qu ZG, Zhang NZ, Yue L, Jia WZ, Luo JX, *et al.* Molecular characterization of enolase gene from *Taenia multiceps*. *Res Vet Sci.* 2015;102:53-8.
80. Ranasinghe SL, Fischer K, Gobert GN, McManus DP. A novel coagulation inhibitor from *Schistosoma japonicum*. *Parasitology.* 2015;142(14):1663-72.
81. Ranasinghe SL, Fischer K, Gobert GN, McManus DP. Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Parasit Vectors.* 2015;8:408.
82. Tong Y, Yue J, Mao M, Liu Q, Zhou J, Yang J. Recombinant nematode anticoagulant protein c2 inhibits cell invasion by decreasing uPA expression in NSCLC cells. *Oncol Rep.* 2015;33(4):1815-22.
83. Valdivieso E, Perteguer MJ, Hurtado C, Campioli P, Rodríguez E, Saborido A, *et al.* ANISERP: a new serpin from the parasite *Anisakis simplex*. *Parasit Vectors.* 2015;8:399.
84. Zhang S, Guo A, Zhu X, You Y, Hou J, Wang Q, *et al.* Identification and functional characterization of alpha-enolase from *Taenia pisiformis* metacestode. *Acta Trop.* 2015;144:31-40.
85. Zhu Y, Lin Y, Liu A, Shui M, Li R, Liu X, *et al.* Structure-guided creation of AcAP5-derived and platelet targeted factor Xa inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 2015;95(4):253-62.
86. Da'dara AA, de Laforcade AM, Skelly PJ. The impact of schistosomes and schistosomiasis on murine blood coagulation and fibrinolysis as determined by thromboelastography (TEG). *J Thromb Thrombolysis.* 2016;41(4):671-7.
87. Takashima Y, Onoda I, Chiou SP, Kitoh K. In vitro canine platelet aggregation caused by *Dirofilaria immitis* extract. *J Vet Med Sci.* 2017;79(2):387-92.

88. Ayón-Núñez DA, Fragoso G, Espitia C, García-Varela M, Soberón X, Rosas G, *et al.* Identification and characterization of *Taenia solium* enolase as a plasminogen-binding protein. *Acta Trop.* 2018;182:69-79.
89. Elzoheiry M, Da'dara AA, deLaforcade AM, El-Beshbishi SN, Skelly PJ. The Essential Ectoenzyme SmNPP5 from the Human Intravascular Parasite *Schistosoma mansoni* is an ADPase and a Potent Inhibitor of Platelet Aggregation. *Thromb Haemost.* 2018;118(6):979-89.
90. 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.
91. Leontovyč 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.
92. 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.
93. Zhang Y, Guo J, He L, Zong HY, Cai GB. Isolation and characterization of a novel serine protease inhibitor, S_jSPI, from *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int.* 2018;67(4):415-24.
94. Zhang S, You Y, Luo X, Zheng Y, Cai X. Molecular and biochemical characterization of *Taenia solium* α -enolase. *Vet Parasitol.* 2018;254:36-42.
95. 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.
96. 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.

Anexo V

Para facilitar la visualización de la tabla que contiene la información relevante para la revisión de alcance que fue extraída de las fuentes de evidencia seleccionadas, esta se encuentra disponible para su consulta en el siguiente enlace y código QR a Google Drive (Google LLC):

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1Aog7tFV8rN8vmvMi_ug_MRWWyoo3Zu-J/edit?usp=sharing&ouid=114081979919066827063&rtpof=true&sd=true



Dicha información fue obtenida siguiendo el protocolo descrito en el *Anexo III*. Todas las celdas que aparecen vacías corresponden a datos que no pudieron ser extraídos de las publicaciones analizadas. Se empleó el símbolo «-» para reflejar esta falta de información en aquellos casos en los que se insertaron otros datos en la misma celda o cuando los datos a introducir no correspondían a la celda en cuestión. Toda la información contenida en la tabla se muestra en inglés debido a que todas las publicaciones científicas revisadas estaban escritas en este idioma.

Anexo VI

Interacciones moleculares identificadas en la revisión de alcance entre cada especie de helminto parásito y el sistema hemostático de sus hospedadores vertebrados.

Especie de helminto parásito	Interacción con el sistema hemostático
<i>Ancylostoma caninum</i>	<p>Inhibición de la agregación de plaquetas</p> <p>Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación</p> <p>Inhibición del complejo TF-FVIIa</p> <p>Inhibición del FXIa</p> <p>Inhibición del FXa</p> <p>Inhibición del complejo FXa-FVa</p> <p>Unión del FX</p> <p>Unión del FXa</p> <p>Degradación del FG</p> <p>Degradación del PLG</p> <p>Disminución en la expresión del uPA</p>
<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	<p>Inhibición de la agregación de plaquetas</p> <p>Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación</p> <p>Inhibición del complejo TF-FVIIa</p> <p>Inhibición del FXa</p> <p>Unión del FXa</p>
<i>Ancylostoma duodenale</i>	<p>Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación</p> <p>Inhibición del FXIa</p> <p>Inhibición del FXa</p>
<i>Anisakis simplex</i>	<p>Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación</p> <p>Inhibición de la trombina</p>
<i>Ascaris lumbricoides</i>	<p>Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación</p> <p>Inhibición de la conversión del FG en fibrina</p>
<i>Ascaris suum</i>	<p>Inhibición de la agregación de plaquetas</p> <p>Inhibición de las vías intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación</p>
<i>Brugia malayi</i>	<p>Inhibición de la agregación de plaquetas</p> <p>Incremento en la transcripción del PAI-1</p>
<i>Clonorchis sinensis</i>	<p>Inhibición de la trombina</p> <p>Unión del PLG</p>
<i>Dirofilaria immitis</i>	<p>Inducción de la agregación de plaquetas</p> <p>Inhibición de la agregación de plaquetas</p> <p>Inhibición de la activación de plaquetas</p> <p>Degradación del FG</p> <p>Unión del PLG</p> <p>Activación del PLG (por el tPA)</p> <p>Incremento en la expresión del tPA</p> <p>Incremento en la expresión del uPA</p> <p>Disminución en la expresión del PAI-1</p>

<i>Dracunculus medinensis</i>	Activación del PLG
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Inhibición de la plasmina
<i>Echinostoma caproni</i>	Unión del PLG
<i>Fasciola hepatica</i>	Inhibición de las vías extrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Inhibición de la conversión del FG en fibrina Activación de las vías intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Degradación del FG Degradación de la fibrina Unión del PLG Activación del PLG (por el tPA)
<i>Gymnorhynchus gigas</i>	Degradación del FG
<i>Haemonchus contortus</i>	Inhibición de la agregación de plaquetas Inhibición de la coagulación Inhibición de la conversión del FG en fibrina Activación de las vías intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Unión del FXa Degradación del FG Inhibición de la reagregación de la fibrina
<i>Lagochilascaris minor</i>	Degradación del FG
<i>Necator americanus</i>	Inhibición de la agregación de plaquetas Inhibición de la liberación de gránulos de las plaquetas Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Inhibición del FXa Degradación del FG
<i>Onchocerca cervicalis</i>	Inducción de la agregación de plaquetas
<i>Onchocerca volvulus</i>	Unión del PLG
<i>Ostertagia ostertagi</i>	Degradación del FG
<i>Paragonimus westermani</i>	Inhibición de la trombina
<i>Schistosoma bovis</i>	Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Unión del PLG Activación del PLG (por el tPA y sin activador del PLG)
<i>Schistosoma haematobium</i>	Activación del PLG (por el tPA)
<i>Schistosoma japonicum</i>	Inhibición de las vías intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Inhibición del FXa Inhibición de la trombina Unión del PLG Activación del PLG (por el tPA)
<i>Schistosoma mansoni</i>	Unión del vWF Inducción de la adhesión de plaquetas Inhibición de la adhesión de plaquetas Inhibición de la agregación de plaquetas Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Inhibición del FXIIa Inhibición del FXa Inhibición de la trombina

	Unión de la trombina Unión del FG Degradación del FG Degradación de la fibrina Unión del PLG Activación del PLG (por el tPA y el uPA) Activación del tPA
<i>Taenia multiceps</i>	Unión del PLG
<i>Taenia pisiformis</i>	Unión del PLG Activación del PLG (por el uPA)
<i>Taenia solium</i>	Unión de plaquetas Inhibición de la agregación de plaquetas Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Unión del PLG Activación del PLG (por el tPA)
<i>Taenia taeniaeformis</i>	Inhibición de las vías intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Degradación del FG Degradación del PLG
<i>Trichinella spiralis</i>	Degradación del FG Unión del PLG Degradación del PLG
<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	Degradación del FG Degradación del PLG

Las interacciones identificadas con el sistema de la coagulación aparecen en naranja, mientras que las correspondientes al sistema fibrinolítico se muestran en azul. Abreviaturas: TF-FVIIa, complejo formado entre el factor tisular y el factor VII de la coagulación activado; FXIa, factor XI activado; FXa, factor X activado; FXa-FVa, complejo formado entre los factores X y V de la coagulación activados; FX, factor X; FG, fibrinógeno; PLG, plasminógeno; uPA, activador del plasminógeno de tipo uroquinasa; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno 1; tPA, activador tisular del plasminógeno; vWF, factor de von Willebrand; FXIIa, factor XII activado.

Anexo VII

Información sobre las moléculas parasitarias responsables de la interacción con el sistema hemostático del hospedador con respecto a la especie, el estadio y el compartimento del helminto parásito en el que se identificaron, así como el tipo de interacción que revelaron.

Molécula parasitaria	Especie de helminto	Estadio	Compartimento	Interacción con el sistema hemostático
Actinas	<i>D. immitis</i>	A, L	So, S, ES	Unión del PLG
	<i>S. bovis</i>			Activación del PLG (por el tPA)
	<i>T. solium</i>			Incremento en la expresión del tPA Incremento en la expresión del uPA
Adenilato quinazas	<i>S. bovis</i>	A	S	Unión del PLG
Anexinas	<i>C. sinensis</i>	A, L	So	Unión de plaquetas
	<i>S. bovis</i>			Inhibición de la agregación de plaquetas
	<i>T. solium</i>			Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Unión del PLG Activación del PLG (por el tPA)
Antígeno Sm22.6	<i>S. mansoni</i>	–	–	Inhibición de la coagulación Unión de la trombina Inhibición de la trombina
Aspartato-proteasas	<i>H. contortus</i>	A, L	So, ES	Degradación del FG
	<i>N. americanus</i>			
	<i>O. ostertagi</i>			
	<i>T. circumcincta</i>			
	<i>T. spiralis</i>			
ATP: guanidino quinazas	<i>S. bovis</i>	A	S	Unión del PLG
Calpáinas	<i>F. hepatica</i>	A	ES	Inhibición de las vías extrínseca y/o común de la cascada de la coagulación
				Inhibición de la conversión del FG en fibrina
				Activación de las vías intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación
Calreticulinas	<i>H. contortus</i>	A	So	Inhibición de la coagulación Unión del FXa
Carbohidratos	<i>D. immitis</i>	A	–	Inhibición de la agregación de plaquetas
				Inhibición de la activación de plaquetas
Catepsinas	<i>A. caninum</i>	A	ES	Degradación del FG
	<i>F. hepatica</i>			Degradación de la fibrina
	<i>N. americanus</i>			Unión del PLG
Ciclofilinas	<i>D. immitis</i>	A	S	Unión del PLG

Cisteína-proteasas	<i>F. hepatica</i> <i>G. gigas</i> <i>H. contortus</i> <i>O. ostertagi</i> <i>T. spiralis</i>	A, L	So, ES	Inhibición de las vías extrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Inhibición de la conversión del FG en fibrina Activación de las vías intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Degradación del FG
Colágeno	<i>O. cervicalis</i>	A	S	Inducción de la agregación de plaquetas
Dihidrolipoil deshidrogenasas	<i>F. hepatica</i>	A	ES	Unión del PLG
Dipeptidil peptidasa IV	<i>H. contortus</i>	A	So	Degradación del FG Inhibición de la reagregación de la fibrina
Ectonucleótido pirofosfatasa/ Fosfodiesterasa	<i>S. mansoni</i>	A	–	Inhibición de la agregación de plaquetas
Enolasas	<i>C. sinensis</i> <i>D. immitis</i> <i>E. caproni</i> <i>F. hepatica</i> <i>O. volvulus</i> <i>S. bovis</i> <i>S. japonicum</i> <i>S. mansoni</i> <i>T. multiceps</i> <i>T. pisiformis</i> <i>T. solium</i> <i>T. spiralis</i>	A, L	So, S, ES	Unión del PLG Activación del PLG (por el tPA y el uPA)
Enzima de tipo plasmina	<i>S. mansoni</i>	H	So	Degradación del FG
Fasciclinas	<i>T. solium</i>	L	So	Unión del PLG
Fosfoglicerato mutasas	<i>S. bovis</i>	A	S	Unión del PLG
Fructosa-bisfosfato aldolasas	<i>D. immitis</i> <i>F. hepatica</i> <i>S. bovis</i>	A	S, ES	Unión del PLG Activación del PLG (por el tPA) Incremento en la expresión del tPA Incremento en la expresión del uPA
Galectinas	<i>D. immitis</i>	A	S, ES	Unión del PLG Activación del PLG (por el tPA) Incremento en la expresión del uPA
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas	<i>C. sinensis</i> <i>D. immitis</i> <i>F. hepatica</i> <i>O. volvulus</i> <i>S. bovis</i>	A	S, ES	Unión del PLG Activación del PLG (por el tPA) Incremento en la expresión del uPA
Glutamato deshidrogenasas	<i>F. hepatica</i>	A	ES	Unión del PLG
Glutación-S-transferasas	<i>F. hepatica</i>	A	ES	Unión del PLG

Hipotética (clon secuencia ARNm ZZD114)	<i>S. bovis</i>	A	S	Unión del PLG
Homólogo del factor de crecimiento transformante b	<i>B. malayi</i>	L	–	Activación de la transcripción del PAI-1
Inhibidor de plaquetas de anquilostoma	<i>A. caninum</i>	A	So	Inhibición de la agregación de plaquetas
Lectina de unión a beta-galactósido	<i>D. immitis</i>	A	S	Unión del PLG
Malato deshidrogenasa citosólica	<i>T. solium</i>	L	So	Unión del PLG
Metaloproteasas	<i>F. hepatica</i> <i>H. contortus</i> <i>O. ostertagi</i> <i>T. circumcincta</i> <i>T. vitrinus</i>	A, L	ES	Inhibición de las vías extrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Inhibición de la conversión del FG en fibrina Activación de las vías intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Degradación del FG Degradación del PLG
Ov87	<i>D. immitis</i>	A	ES	Unión del PLG
Péptidos/proteínas anticoagulantes de <i>Ancylostoma</i> spp.	<i>A. caninum</i> <i>A. ceylanicum</i> <i>A. duodenale</i>	A	So	Inhibición de la agregación de plaquetas Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Inhibición del complejo TF-FVIIa Inhibición del FXIa Inhibición del FXa Inhibición del complejo FXa-FVa Unión del FX Unión del FXa Disminución en la expresión del uPA
Precursor de transglutaminasas	<i>D. immitis</i>	A	ES	Unión del PLG
Procatepsina L1	<i>F. hepatica</i>	A	ES	Unión del PLG
Proteína antioxidante específica de tior	<i>F. hepatica</i>	A	ES	Unión del PLG
Proteína chaperona HSP60	<i>D. immitis</i>	A	ES	Unión del PLG
Proteína con dominio del conjunto inmunoglobulina I	<i>D. immitis</i>	A	S	Unión del PLG
Proteína con dominio MSP con dominio rico en Glu	<i>D. immitis</i>	A	S	Unión del PLG

Proteínas de tipo Kunitz	<i>S. japonicum</i> <i>S. mansoni</i>	A	–	Inhibición de las vías extrínseca, intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Inhibición del FXa
Proteína de unión a ácidos grasos	<i>F. hepatica</i>	A	ES	Unión del PLG
Proteína disulfuro isomerasa	<i>F. hepatica</i>	A	ES	Unión del PLG
Proteína hipotética	<i>S. bovis</i>	A	S	Unión del PLG
Proteína hipotética LOAG_14743	<i>D. immitis</i>	A	ES	Unión del PLG
Proteína hipotética T265_01567	<i>F. hepatica</i>	A	ES	Unión del PLG
Proteína quinasa activada por mitógeno	<i>T. solium</i>	L	So	Unión del PLG
Proteína principal espermática	<i>D. immitis</i>	A	S	Unión del PLG
Proteína SJCHGC01945	<i>F. hepatica</i>	A	ES	Unión del PLG
Proteínas del tipo alérgeno de veneno	<i>S. mansoni</i>	–	ES	Unión de la trombina Unión del PLG Activación del PLG (por el uPA)
P22U	<i>D. immitis</i>	A	ES	Unión del PLG
Serina-proteasas	<i>F. hepatica</i> <i>G. gigas</i> <i>H. contortus</i> <i>N. americanus</i> <i>O. ostertagi</i> <i>S. mansoni</i> <i>T. spiralis</i>	A, H, L	So, ES	Inhibición de las vías extrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Inhibición de la conversión del FG en fibrina Activación de las vías intrínseca y/o común de la cascada de la coagulación Degradación del FG Degradación de la fibrina Activación del PLG Degradación del PLG Activación del tPA
Serpinas	<i>A. simplex</i> <i>C. sinensis</i> <i>E. multilocularis</i> <i>H. contortus</i> <i>P. westermani</i> <i>S. japonicum</i>	A, L	So	Inhibición de la coagulación Inhibición de la trombina Inhibición de la plasmina
Tiorredoxina glutatión reductasa	<i>F. hepatica</i>	A	ES	Unión del PLG
Triosa fosfato isomerasa	<i>F. hepatica</i> <i>S. bovis</i>	A	S, ES	Unión del PLG

Las interacciones identificadas con el sistema de la coagulación aparecen en naranja, mientras que las correspondientes al sistema fibrinolítico se muestran en azul. El símbolo «↔» indica que los datos correspondientes a la celda en cuestión no pudieron ser extraídos de las fuentes de evidencia seleccionadas.

Abreviaturas: A, adulto; L, larva; H, huevo; So, somático; S, superficie; ES, excretor/secretor; PLG, plasminógeno; tPA, activador tisular del plasminógeno; uPA, activador del plasminógeno de tipo uroquinasa; FG, fibrinógeno; FXa, factor X activado; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno 1; TF-FVIIa, complejo formado entre el factor tisular y el factor VII de la coagulación activado; FXIa, factor XI activado; FXa-FVa, complejo formado entre los factores X y V de la coagulación activados; FX, factor X.

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

aa	Aminoácidos
ACN	Acetonitrilo
ADP	Adenosín difosfato
APAS-3	Proteína alergénica de <i>Ascaris suum</i> 3
APC	Proteína C activada
APS	Persulfato de amonio
APTT	Tiempo de tromboplastina parcial activada
AsHb	Hemoglobina de <i>Ascaris suum</i>
ATP	Adenosín trifosfato
AT-III	Antitrombina III
A2AP	α_2 -antiplasmina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Seroalbúmina bovina
CHAPS	3-[[3-colamidopropil]dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico - ácido α -ciano-2,4-difluorocinámico - ácido α -ciano-2,3,4,5,6-pentafluorocinámico
CID	Disociación inducida por colisión
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
C3	Componente 3 del complemento
C5	Componente 5 del complemento
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción enzimática
FA	Ácido fórmico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FV	Factor V de la coagulación
FVa	Factor V de la coagulación activado
FVII	Factor VII de la coagulación
FVIIa	Factor VII de la coagulación activado
FVIII	Factor VIII de la coagulación
FVIIIa	Factor VIII de la coagulación activado
FIX	Factor IX de la coagulación
FIXa	Factor IX de la coagulación activado
FIXa-FVIIIa	Complejo formado por los factores de la coagulación IX y VIII activados
FX	Factor X de la coagulación
FXa	Factor X de la coagulación activado
FXa-FVa	Complejo formado por los factores de la coagulación X y V activados
FXI	Factor XI de la coagulación

FXIa	Factor XI de la coagulación activado
FXII	Factor XII de la coagulación
FXIIa	Factor XII de la coagulación activado
FXIII	Factor XIII de la coagulación
FXIIIa	Factor XIII de la coagulación activado
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GLA	Ácido γ -carboxiglutámico
Glu-P1g	Plasminógeno con ácido glutámico en el extremo aminoterminal
GT-WS	«Manchas de leche» de tipo granulado
HEPES	Ácido 4-[2-hidroxietil]-1-piperazina-etanosulfónico
HMWK	Cinínógeno de alto peso molecular
IEF	Isoelectroenfoque
IFN-γ	Interferón γ
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
LC-MS/MS	Cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem
LN-WS	«Manchas de leche» de tipo linfonodular
Lys-P1g	Plasminógeno con lisina, valina o metionina en el extremo aminoterminal
L1	Larva de primer estadio
L2	Larva de segundo estadio
L3	Larva de tercer estadio
L3As	Larva de tercer estadio de <i>Ascaris suum</i>
L3AsES	Extracto excretor/secretor de larvas de tercer estadio de <i>Ascaris suum</i>
L3AsS	Extracto de superficie de larvas de tercer estadio de <i>Ascaris suum</i>
L4	Larva de cuarto estadio
MALDI-TOF/TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo
MeSH	Medical Subject Headings
MIF	Mertiolato-yodo-formol

MMP	Metaloproteasa de matriz
MMP1	Metaloproteasa de matriz 1
MMP3	Metaloproteasa de matriz 3
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
m/m	Masa-masa
m/v	Masa-volumen
NAPc2	Proteína anticoagulante c2 del nematodo <i>Ancylostoma caninum</i>
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NEM	N-etilmaleimida
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	Diclorhidrato de o-fenilendiamina
PAI	Inhibidor de los activadores del plasminógeno
PAI-1	Inhibidor de los activadores del plasminógeno 1
PAI-2	Inhibidor de los activadores del plasminógeno 2
PAI-3	Inhibidor de los activadores del plasminógeno 3
PAS-1	Proteína supresora de <i>Ascaris suum</i> 1
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pI	Punto isoelectrico
PK	Precalicerina
PL	Fosfolípidos
PLG	Plasminógeno
Plg-R_{KT}	Receptor del plasminógeno KT
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRISMA-ScR	Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses extension for Scoping Reviews
pro-uPA	Prouroquinasa
PT	Tiempo de protrombina
rAs14	Proteína recombinante de 14-kDa de <i>Ascaris suum</i>
rAs16	Proteína recombinante de 16-kDa de <i>Ascaris suum</i>
rAs24	Proteína recombinante de 24-kDa de <i>Ascaris suum</i>
rAs37	Proteína recombinante de 37-kDa de <i>Ascaris suum</i>
sc-tPA	Activador tisular del plasminógeno de cadena sencilla
sc-uPA	Activador del plasminógeno de tipo uroquinasa de cadena sencilla
SD	Desviación estándar
SDS	Sodio dodecilsulfato
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
Serpina	Inhibidor de proteasas de serina

TAFI	Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
TAFIa	Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina activado
tc-tPA	Activador tisular del plasminógeno de cadena doble
tc-uPA	Activador del plasminógeno de tipo uroquinasa de cadena doble
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TF	Factor tisular
TFA	Ácido trifluoroacético
TFPI	Inhibidor de la ruta del factor tisular
TFPIα	Isoforma α del inhibidor de la ruta del factor tisular
TFPIβ	Isoforma β del inhibidor de la ruta del factor tisular
TF-FVIIa	Complejo formado por el factor tisular y el factor VII de la coagulación activado
Th1	Linfocito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfocito T <i>helper</i> 2
tPA	Activador tisular del plasminógeno
TPCK	Tosil-fenilalanina-clorometil cetona
Tris	Tris[hidroximetil]aminometano
TT	Tiempo de trombina
T-PBS	Tampón compuesto por tampón fosfato salino y Tween ₂₀
uPA	Activador del plasminógeno de tipo uroquinasa
uPAR	Receptor del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa
VAL	Alérgenos del veneno
vWF	Factor de von Willebrand
V/P	Volumen-precipitado
v/v	Volumen-volumen
WOS CC	Web of Science Core Collection
ϵ-ACA	Ácido ϵ -aminocaproico
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional

PUBLICACIONES
CIENTÍFICAS

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

1. **Interaction of helminth parasites with the haemostatic system of their vertebrate hosts: a scoping review**

Alicia Diosdado, Fernando Simón, Judit Serrat, Javier González-Miguel

Parasite. 2022;29:35. doi: 10.1051/parasite/2022034

Factor de impacto (WOS, 2021): 3,020. Posición: 16/39 (Parasitology) Q2



2. **Host-Parasite Relationships in Porcine Ascariasis: Anticoagulant Potential of the Third Larval Stage of *Ascaris suum* as a Possible Survival Mechanism**

Alicia Diosdado, Fernando Simón, Rodrigo Morchón, Javier González-Miguel

Animals. 2021;11(3):804. doi: 10.3390/ani11030804

Factor de impacto (WOS, 2021): 3,231. Posición: 16/145 (Veterinary Sciences) Q1



3. **Pro-fibrinolytic potential of the third larval stage of *Ascaris suum* as a possible mechanism facilitating its migration through the host tissues**

Alicia Diosdado, Fernando Simón, Rodrigo Morchón, Javier González-Miguel

Parasites & Vectors. 2020;13(1):203. doi: 10.1186/s13071-020-04067-5

Factor de impacto (WOS, 2020): 3,876. Posición: 3/23 (Tropical Medicine) Q1



