



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE *Taenia solium* QUE UNEN  
PLASMINÓGENO Y SU POSIBLE RELEVANCIA EN LA INVASIÓN DEL  
PARÁSITO A LOS DIFERENTES TEJIDOS DEL HUÉSPED

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
M. en C. DOLORES ADRIANA AYÓN NÚÑEZ

DIRECTOR DE TESIS  
DR. RAÚL JOSÉ BOBES RUIZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
COMITÉ TUTOR  
DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZALEZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DR. RÚBEN GERERDO CONTRERAS PATIÑO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS  
CINVESTAV

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas.....	III
Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	VI
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Taenia solium</i> .....	1
1.1.1 Ciclo de vida del parásito.....	2
1.2 Plasminógeno.....	3
1.2.1 Cascada de coagulación y plasminógeno .....	5
1.2.2 Activadores e inhibidores fisiológicos del plasminógeno/plasmina.....	6
1.2.3 Participación de plasminógeno/plasmina en otros procesos celulares.....	7
1.3 Receptores de Plasminógeno.....	8
1.3.1 Receptores de plasminógeno en patógenos: bacterias y hongos.....	9
1.3.2 Receptores de plasminógeno en parásitos: intracelulares y extracelulares.....	10
1.4 Enolasa.....	14
1.4.1 Estructura de la enolasa.....	15
1.4.2 Enolasa: proteína de unión a plasminógeno.....	16
2. ANTECEDENTES.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. PREGUNTA.....	19
5. HIPÓTESIS.....	19
6. OBJETIVOS.....	19
6.1 Objetivo general.....	19
6.2 Objetivos específicos.....	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7.1 Obtención de cisticercos de <i>T. solium</i> .....	20
7.2 Obtención de extracto soluble de proteínas.....	20
7.3 Separación de proteínas solubles por electroforesis en doble dimensión (2D-SDS-	

PAGE).....	20
7.4 <i>Ligand blotting</i> con plasminógeno humano.....	21
7.5 Identificación de proteínas que unen Plg por espectrometría de masas MS/MS (MALDI TOF/TOF).....	22
7.6 Análisis bioinformático de las isoformas de enolasa de <i>T. solium</i> .....	22
7.7 Expresión de las isoformas de enolasa de cisticerco. RT-PCR.....	23
7.8 Clonación, expresión y purificación de las enolasas de <i>T. solium</i> .....	24
7.9 Ensayo de unión a plasminógeno humano en microplaca.....	25
7.10 Ensayo de activación de plasminógeno con rTsEnoA en solución.....	25
7.11 Medición de la actividad enzimática de rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4.....	26
7.12 Producción de anticuerpos anti-rTsEnoA, anti-rTsEnoC y anti-rTsEno4.....	26
7.13 Inmunolocalización de enolasa en cisticerco de <i>Taenia solium</i> .....	27
8. RESULTADOS.....	29
8.1 Identificación de las proteínas de <i>T. solium</i> que unen plasminógeno humano.....	29
8.2 Caracterización de las isoformas de enolasa de <i>Taenia solium</i> .....	31
8.3 Evaluación de la capacidad de la enolasa recombinante de <i>T. solium</i> (rTsEnoA) de unir y activar plasminógeno humano.....	34
8.4 Evaluación de la expresión de las isoformas de enolasa en cisticerco de <i>T. solium</i> .....	37
8.5 Clonación y expresión de TsEno3 y TsEno4.....	39
8.6 Evaluación de la capacidad de rTsEnoC y rTsEno4 de unir plasminógeno humano.....	40
8.7 Actividad enzimática de rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4.....	42
8.8 Evaluación de los anticuerpos anti-rTsEnoA, anti-rTsEnoC y anti-rTsEno4.....	42
8.9 Inmunolocalización de enolasa en cisticerco de <i>Taenia solium</i> .....	44
9. DISCUSIÓN.....	46
10. CONCLUSIONES.....	55
11. PERSPECTIVAS.....	56
12. BIBLIOGRAFIA.....	57
13. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	68
14. ANEXOS.....	70

## ABREVIATURAS

<i>T. solium</i>	<i>Taenia solium</i>
Plg	Plasminógeno
εACA	Ácido ε-aminocaproico
tPA	Activador tisular de plasminógeno
NC	Neurocisticercosis
AP	Activadores del plasminógeno
Plm	Plasmina
MEC	Matriz extracelular
LACK	Leishmania homólogo de receptores para la C-quinasa activada
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
SP	Dominio serina proteasa
<i>D. immitis</i>	<i>Dirofilaria immitis</i>
<i>S. bovis</i>	<i>Schistosoma bovis</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
cMDH	Malato deshidrogenasa citosólica
ATP	Adenosín trifosfato
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
2D-SDS-PAGE	Electroforesis bidimensional en SDS-PAGE
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MS	Espectrometría de masas
rTsEnoA	Enolasa recombinante de <i>T. solium</i> A
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
FBA	Fructosa-bisfosfato aldolasa
PGK	Fosfoglicerato quinasa
FBA	Fructosa-bisfosfato aldolasa

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de <i>Taenia solium</i> , cisticercosis.....	2
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. solium</i> .....	3
Figura 3. Estructura del plasminógeno humano .....	5
Figura 4. Mecanismos de unión de plasminógeno/plasmina en la superficie de las células bacterianas y su papel en las interacciones entre bacterias y huéspedes .....	8
Figura 5. Docking molecular y mecanismo de unión plasminógeno- enolasa superficial estreptocócica (SEN).....	10
Figura 6. Enolasa en la vía de la Glicólisis.....	14
Figura 7. Ensayo de unión al plasminógeno en un extracto total de proteínas de cisticercos de <i>T. solium</i> por 2D SDS-PAGE.....	17
Figura 8. Esquema de inmunización.....	27
Figura 9. Identificación de las proteínas que unen plasminógeno por MS/MS (MALDI TOF/TOF).....	29
Figura 10. Alineamiento de las isoformas de enolasa identificadas en el genoma de <i>Taenia solium</i> .....	31
Figura 11. Árbol filogenético de enolasas incluyendo las enolasas de <i>Taenia solium</i> .....	33
Figura 12. Enolasa recombinante de <i>Taenia solium</i> .....	35
Figura 13. Ensayo de unión a plasminógeno con enolasa recombinante de <i>Taenia solium</i> .....	35
Figura 14. Cinética de activación de plasminógeno con tPA en presencia de rTsEnoA.....	36
Figura 15. Ensayo de activación de plasminógeno con tPA en presencia de rTsEnoA a las 6 h.	37
Figura 16. Amplificación de las isoformas de enolasa en cisticerco de <i>T. solium</i> .....	38
Figura 17. Clonación de TsEno3 y TsEno4.....	38
Figura 18. Expresión de rTsEnoC y rTsEno4.....	39
Figura 19. Purificación de rTsEnoC y rTsEno4.....	40
Figura 20. Western blot de rTsEnoC y rTsEno4 en presencia de anticuerpo anti-Histidina.....	40
Figura 21. <i>Ligand blotting</i> de plasminógeno en presencia de rTsEnoC y rTsEno4.....	41

Figura 22. ELISA de unión a plasminógeno en presencia de rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4.....	41
Figura 23. Actividad enzimática de rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4.....	42
Figura 24. Titulación de anticuerpos anti- rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4 hechos en conejo.....	43
Figura 25. Western blot con anticuerpos anti- rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4 hechos en conejo.....	44
Figura 26. Inmunolocalización de TsEnoA en cisticerco.....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas de unión a plasminógeno en parásitos intracelulares.....	11
Tabla 2. Proteínas de unión a plasminógeno en parásitos extracelulares.....	13
Tabla 3. Oligonucleótidos para la amplificación (PCR) de las isoformas de enolasa.....	24
Tabla 4. Proteínas de <i>Taenia solium</i> que unen plasminógeno humano.....	30

## RESUMEN

El cisticerco (fase larvaria) de *Taenia solium* es el agente causal de la cisticercosis humana y porcina. Se desarrolla a partir de la ingestión de huevos, los cuales se activan y eclosionan en el intestino liberando las oncosferas que migran a diferentes tejidos completando su desarrollo. En la cisticercosis, aún se desconocen las estrategias que utiliza el parásito para migrar a los diferentes tejidos del huésped. Sin embargo, en diferentes patógenos se han reportado proteínas receptoras de plasminógeno (Plg) involucradas en el proceso de invasión. Estudios previos en nuestro grupo mostraron que diferentes proteínas de *T. solium* tienen la capacidad de unir plasminógeno, entre ellas, la enolasa. El objetivo de este trabajo fue identificar en el cisticerco de *T. solium* otras proteínas que unen plasminógeno y evaluar si la enolasa recombinante de *T. solium* (rTsEnoA) mantiene la capacidad de unir y activar plasminógeno humano. También se identificaron y caracterizaron las diferentes isoformas de enolasa. Para la identificación de las proteínas con capacidad de unir Plg, se realizó *ligand blotting* en 2D-SDS-PAGE. Las proteínas correspondientes a los puntos reconocidos se identificaron por MS/MS. Siete proteínas mostraron su capacidad de unir Plg: fascicilina-1, fascicilina-2, enolasa, MAPK, anexina, actina y malato deshidrogenasa citosólica. Una vez identificadas, se profundizó en el estudio de la enolasa. Realizando una búsqueda en el genoma del parásito se identificaron cuatro isoformas. Para comprender mejor la filogenia de la enolasa en *T. solium*, se realizó un análisis de inferencia filogenética que incluyó 75 secuencias de aminoácidos de enolasa de diferentes organismos. A excepción de Eno4, el origen de las isoformas de enolasa de platelmintos es independiente de sus contrapartes de vertebrados. Por lo que en este trabajo propusimos designar a las isoformas de *T. solium* como A, B, C y 4. Para determinar si la rTsEnoA unía Plg humano, se realizó un *ligand blotting* y los resultados se confirmaron mediante ELISA tanto en presencia como en ausencia de un inhibidor de la unión a Plg ( $\epsilon$ ACA). Los resultados mostraron que el Plg unido a rTsEnoA se activó a plasmina en presencia del activador tisular de plasminógeno (tPA). En conclusión, la enolasa recombinante mostró una fuerte actividad de unión y activación del plasminógeno *in vitro*. La enolasa de *T. solium* podría desempeñar un papel en la invasión del parásito junto con otras proteínas de unión al plasminógeno.

## ABSTRACT

*Taenia solium* cysticerci (larval stage) are the causative agent of human and swine cysticercosis. They develop after ingesting *T. solium* eggs, which are activated and hatch in the host's intestine, releasing oncospheres that migrate to different tissues, where they transform into cysticerci. While the strategies used by the parasite to migrate to the host tissues are still unknown, plasminogen (Plg)-receptor proteins have been reported as involved in invasion processes for various pathogens. Previous works by our group have demonstrated that several *T. solium* proteins, including enolase, are capable of binding Plg. This work is aimed to identify other Plg-binding proteins in *T. solium* cysticerci, and to evaluate whether recombinant *T. solium* enolase (rTsEnoA) can bind and activate human Plg. Additionally, different enolase isoforms were identified and characterized. To identify proteins with a capacity to bind Plg, a *ligand blotting* assay was performed on 2D-SDS-PAGE. The proteins corresponding to recognized spots were identified by MS/MS. Seven proteins showed Plg-binding capacity: fasciclin-1, fasciclin-2, enolase, MAPK, annexin, actin, and cytosolic malate dehydrogenase. Among the proteins identified, enolase was chosen for in-depth study. Four enolase isoforms were identified by searching in the parasite genome. To better understand the phylogeny of *T. solium* enolase, a phylogenetic inference analysis was performed including 75 amino acid sequences of enolase from various organisms. Except for Eno4, the origin of the enolase isoforms in plathelminths is independent of their homologues in vertebrates. Therefore, herein we propose to designate *T. solium* enolase isoforms as A, B, C, and 4. To determine whether rTsEnoA bound human Plg, a *ligand blotting* assay was performed, confirming the results by ELISA both in the presence and in the absence of the plasminogen binding inhibitor ( $\epsilon$ ACA). Our results indicate that rTsEnoA-bound Plg was activated into plasmin in the presence of the tissue plasminogen activator (tPA). In conclusion, recombinant enolase showed strong Plg binding and activating activity *in vitro*. *T. solium* enolase could be playing a role in parasite invasion, along with other Plg-binding proteins.

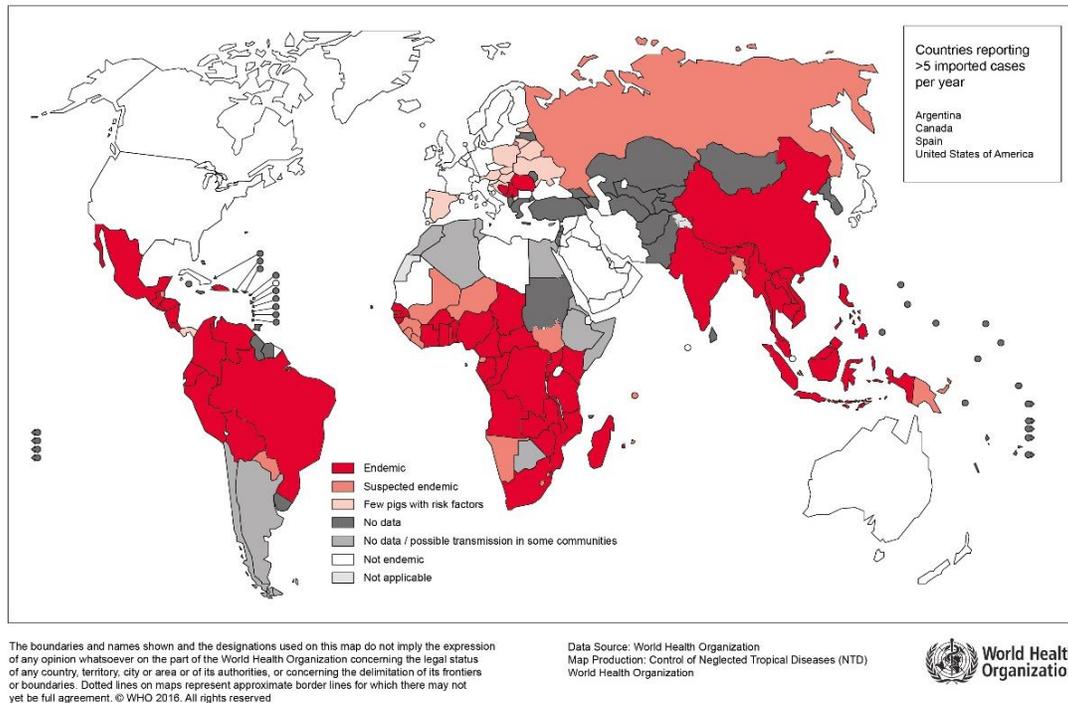
# IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE *Taenia solium* QUE UNEN PLASMINÓGENO Y SU POSIBLE RELEVANCIA EN LA INVASIÓN DEL PARÁSITO A LOS DIFERENTES TEJIDOS DEL HUÉSPED

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Taenia solium*

*Taenia solium* es el agente causal de la cisticercosis humana y porcina. La cisticercosis, es causa considerable de morbilidad en los seres humanos y de pérdidas económicas en porcinos en países en desarrollo de Latinoamérica, África y Asia (Fleury *et al.*, 2012). La enfermedad es casi inexistente en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Europa, Australia, Japón, Nueva Zelanda y en la mayoría de los países musulmanes. En estas regiones los casos reportados de cisticercosis se consideran como resultado de la migración de personas provenientes de áreas endémicas (Del Brutto, 2012) (Figura 1). Los cisticercos se pueden localizar en diferentes tejidos u órganos del huésped. Cuando el cisticerco se localiza en el Sistema Nervioso Central del humano se le denomina Neurocisticercosis (NC) (Gonzales *et al.*, 2016).

En México, un estudio realizado en el Instituto Nacional de Neurología indicó que la incidencia de la NC se mantuvo relativamente constante entre 1994 y 2004 y mencionan que esta parasitosis continúa siendo un problema de salud pública (Sciutto *et al.*, 2000; Fleury *et al.*, 2011, 2012). Hay reportes que señalan que en México la NC ya no es un problema de salud pública (Flisser *et al.*, 2010), aunque en zonas rurales aisladas aún se reporta alta prevalencia de cisticercosis porcina (Fleury *et al.*, 2012). Por otro lado, un reporte publicado por la WHO (World Health Organization) en el 2015, menciona que la cisticercosis presenta alta prevalencia en los estados de Yucatán, Guanajuato, Guerrero, Morelos, Puebla.

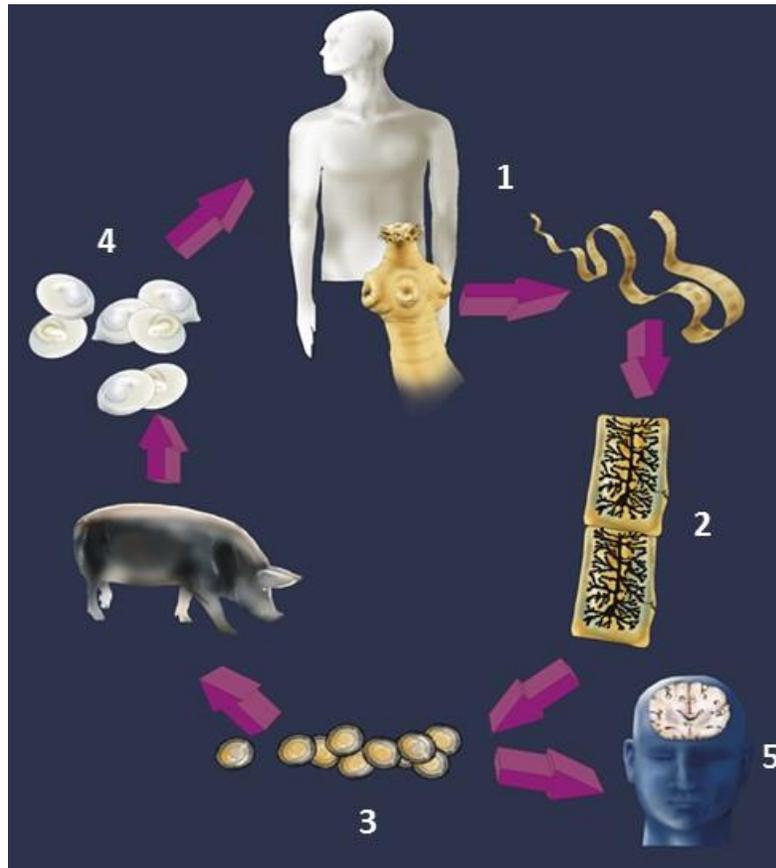


**Figura 1. Distribución geográfica de *Taenia solium*, cisticercosis.** Tomada de: World Health Organization, 2015 ([http://www.who.int/taeniasis/Endemicity\\_Taenia\\_Solium\\_2015.jpg](http://www.who.int/taeniasis/Endemicity_Taenia_Solium_2015.jpg))

### 1.1.1 Ciclo de vida

*Taenia solium* en su ciclo de vida involucra a dos huéspedes, al cerdo como huésped intermediario que desarrolla el cisticerco (larva) y al humano como huésped definitivo que desarrolla la Tenia (gusano adulto). La Tenia se desarrolla en el intestino delgado del humano a partir de la ingestión de cisticercos por el consumo de carne de cerdo infectada y mal cocida. El gusano se adhiere a la pared intestinal a través de la doble corona de ganchos y cuatro ventosas. La Tenia está formada por proglótidos que se van desarrollando de manera continua por debajo del cuello. Los proglótidos más distales del cuello se consideran grávidos ya que pueden llegar a contener cientos de miles de huevos con capacidad infectiva, los cuales, son expulsados en la materia fecal. Los cerdos o de manera accidental los humanos (por malas prácticas de higiene) ingieren los huevos. Durante su paso por el tracto digestivo, los huevos son susceptibles a los jugos gástricos e intestinales que les disgregan los bloques embrioforales y la membrana oncosferal liberando y activando a los embriones (oncosfera).

La oncosfera atraviesa la mucosa del intestino delgado y circula por el torrente sanguíneo hasta llegar a los diferentes tejidos del huésped, donde se transforman en cisticercos, dando como resultado la cisticercosis porcina o humana (o bien, la NC cuando se localizan en el sistema nervioso central) (Flisser, 2013) (Figura 2).

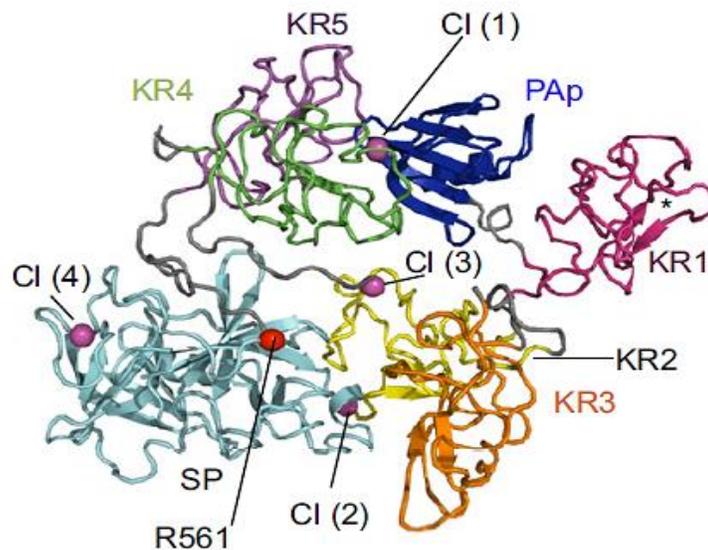


**Figura 2. Ciclo de vida de *T. solium*.** El parásito alterna entre el ser humano como huésped definitivo y el cerdo como principal huésped intermediario. En su estado adulto (1), el platelminto habita el intestino humano. La Tenia produce miles de huevos, que se expulsan en la materia fecal. El cerdo se infecta al ingerir heces donde hay segmentos (proglótidos) (2) o huevos (3) del parásito adulto. Cada huevo tiene el potencial para convertirse en un cisticerco, forma larvaria del parásito, ocasionando la cisticercosis porcina (4). El ciclo se completa cuando el hombre consume carne de cerdo mal cocida infectada con cisticercos. Estos últimos se fijan en las paredes del intestino humano donde maduran hasta convertirse en gusanos adultos (1). La ingesta accidental de huevos, puede ocasionar en el humano, la cisticercosis humana (NC) (5) (Flisser y Ruy., 2006).

## 1.2 Plasminógeno

El plasminógeno es una glicoproteína de 810 aminoácidos, de aproximadamente 90 kDa que se sintetiza en el hígado como una glicoproteína, también conocido como Glu-plasminógeno. Cuando se secreta al plasma, el péptido señal en el extremo N-terminal (19 residuos de aminoácidos) se pierde para convertirse en la forma madura (Castellino and Powell, 1981). El Plg se puede encontrar en dos formas: el Glu-plasminógeno que tiene un residuo de ácido glutámico en el extremo N-terminal y el Lys-plasminógeno que tiene un residuo Lys77 en el extremo N-terminal (Forsgren *et al.*, 1987). Glu-plasminógeno se convierte en Lys-plasminógeno una vez que la plasmina exógena elimina un péptido de 77 aminoácidos en el extremo amino-terminal (Horrevoets *et al.*, 1995). Los activadores fibrinolíticos activan más eficientemente a la Lys-Plg que a la Glu-Plg (Zhang *et al.*, 2003; Markus *et al.*, 1978). Ambas formas de Plg están formadas por siete dominios estructurales, un péptido de activación en la región N-terminal conocido como dominio PAp (1-77 aa), cinco dominios *kringle* (KR1- 5) y un dominio de serina proteasa SP (562- 791 aa) (Figura 3) (Law *et al.*, 2012). Los dominios *kringle* median la unión de Plg mediante sitios de unión a lisina, a sustratos y a receptores de superficie celular. El dominio PAp interactúa con KR4 y KR5, esta interacción es crítica para mantener una conformación cerrada de Plg.

Sin embargo, el Plg también puede estar presente en su conformación abierta (pre-activación), lo que sugiere que una reorganización conformacional expone el sitio de escisión para los activadores del plasminógeno (AP), cuya acción dará como resultado la formación de plasmina, la proteasa activa (Ponting *et al.*, 1992; Law *et al.*, 2012). La plasmina participa en la parte final de la cascada de coagulación, degradando los coágulos de fibrina (fibrinólisis).



**Figura 3. Estructura del plasminógeno humano.** Los dominios son marcados en diferente color: PAp, azul; KR1, rosa; KR2, amarillo; KR3, naranja; KR4, verde; KR5, púrpura; SP, cian. Los iones de cloruro (Cl) 1 y 2 están en la interface KR4 / PAp and KR2 / SP, respectivamente, y se muestran como esferas. Otros dos iones de cloruro 3 y 4, unen al dominio KR2 y SP, respectivamente. La posición del loop de activación está marcado con una esfera roja. El LR de KR1 está marcado con asterisco (\*). Figura tomada y modificada de Law et al., 2012.

### 1.2.1 Cascada de la coagulación y sistema fibrinolítico

La cascada de coagulación es una secuencia compleja de reacciones proteolíticas que termina con la formación del coágulo de fibrina. La cascada de coagulación involucra factores celulares (plaquetas) y proteolíticos que se activan cuando se daña el endotelio de un vaso sanguíneo. El objetivo inmediato es detener el sangrado, facilitar y promover otros mecanismos para el control y la reparación de daños. La cascada de la coagulación procede en dos vías: la intrínseca, formada por los factores VIII, IX, XI, XII y la extrínseca, regulada por la tromboplastina tisular y el factor VII. Ambas vías se fusionan a través de los factores V y X, que requieren fosfolípidos de calcio y plaquetas, lo que resulta en la formación de redes de fibrina conocidas como coágulos (Johari and Loke, 2012).

El sistema fibrinolítico participa en la etapa final de la cascada de la coagulación y su función principal es la eliminación de los coágulos depositados en los vasos sanguíneos, principalmente a través de la acción proteolítica. La reacción central del sistema fibrinolítico es la activación del Plg a plasmina (Plm) (Collen *et al.*, 1993). La degradación de los coágulos depende de la unión de Plg / Plm a los residuos de lisina localizados en el extremo C-terminal y a algunos residuos internos de lisina de las redes de fibrina (y otros receptores); la unión de Plg requiere sitios de unión a lisina localizados en los dominios *Kringle* (Marti *et al.*, 1997).

La plasmina es una serina proteasa de amplio espectro que degrada la fibrina, las matrices extracelulares y el tejido conectivo a través de la participación de otras enzimas proteolíticas, incluidas la colagenasa (MMP-1, La metaloproteinasa-1 de la matriz) (Santala *et al.*, 1999; Law *et al.*, 2013; González-Miguel *et al.*, 2016). Un gran número de patógenos, incluidos los parásitos, expresan receptores de plasminógeno, inmovilizándolo en su superficie, lo que da como resultado su activación. Se ha propuesto que la activación del Plg facilita la migración y la invasión de patógenos a diferentes tejidos en el huésped, así como, los mecanismos de evasión de la respuesta inmune, principalmente a través de la activación de la cascada del complemento (Pancholi and Chhatwal, 2003; Marcilla *et al.*, 2007; Xolalpa *et al.*, 2007; de la Torre-Escudero *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015; Siqueira *et al.*, 2016).

### **1.2.2 Activadores e inhibidores fisiológicos del plasminógeno/plasmina**

La activación de Plg a Plm está mediada por la acción proteolítica de dos tipos principales de activadores de plasminógeno (AP), el de tipo tisular (tPA) y el de tipo uroquinasa (uPA); ambos activan Plg cortando específicamente entre residuos Arg560-Val561, en el dominio SP (Rijken and Lijnen, 2009). Sin embargo, algunas bacterias secretan diferentes AP, como la estreptoquinasa (Streptococci, grupos A, C y G), estafiloquinasa (*Staphylococcus aureus* lisogénico), Pla (*Yersinia pestis*), PauA (secretada por *Streptococcus uberis*) y PadA (*Streptococcus dysgalactiae*) (COLLEN *et al.*, 1993; Wang, 1998; Rosey *et al.*, 1999; Lähteenmäki *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2014; Dentovskaya *et al.*, 2016).

Por otro lado, la fibrinólisis es un proceso altamente regulado involucrado en la hemostasia, que requiere la participación de diferentes inhibidores; los más conocidos son la  $\alpha$ 2-antiplasmina y la  $\alpha$ 2-macroglobulina (inhibidores de la plasmina), PAI-1, PAI-2 y PAI-3 (inhibidores de los activadores del plasminógeno) (Novokhatny *et al.*, 1984; Schneiderman and Loskutoff, 1991; Rijken, 1995; Rijken and Lijnen, 2009). Además, se ha reportado un análogo de lisina, el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico ( $\epsilon$ ACA) que compite por los sitios de unión del plasminógeno, por lo tanto, no permite la unión y conversión del Plg a Plm por los activadores del plasminógeno e inhibe la actividad proteolítica de la Plm (Nahum, 1964).

### **1.2.3 Participación de plasminógeno/plasmina en otros procesos celulares**

Además de su interacción con la fibrina, Plg / Plm puede actuar sobre otras proteínas tales como receptores de superficie celular, componentes de la coagulación (factores V, VIII y X), metaloproteasas, así como componentes estructurales de la matriz extracelular (MEC), que incluyen laminina, fibronectina, factores de complemento (C3 y C5), vitronectina, etc. (Kost *et al.*, 1996; Pryzdial *et al.*, 1999; Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Ogiwara *et al.*, 2010; Barthel *et al.*, 2012; Hsiao *et al.*, 2013). Por lo tanto, Plg/Plm se ha asociado a varias funciones fisiológicas y patológicas: en la fibrinólisis y la hemostasia, degradación de la MEC, crecimiento tumoral, invasión, migración, remodelación tisular, curación de heridas, angiogénesis y evasión de la respuesta inmune (Hsiao *et al.*, 2013; Miles and Parmer, 2013; Principe *et al.*, 2017). También, en diferentes patógenos como bacterias, hongos, protozoos y helmintos se ha estudiado ampliamente el papel del plasminógeno en la invasión, establecimiento y evasión de la respuesta inmune en el huésped, como un mecanismo de patogenicidad. En la Figura 4 se ejemplifica las múltiples participaciones del Plg/Plm en bacterias interactuando con sus huéspedes (Sanderson-Smith *et al.*, 2012).

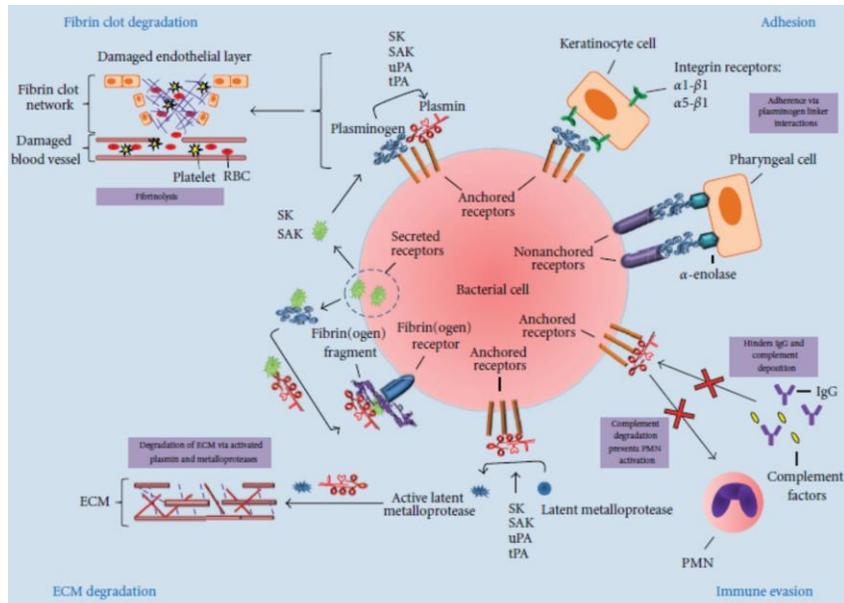


Figura 4. Mecanismos de unión de plasminógeno/plasmina en la superficie de las células bacterianas y su papel en las interacciones entre las bacterias y sus huéspedes. El Plg/Plm puede estar unido directamente a la superficie celular bacteriana vía célula-membrana-receptores de anclaje, receptores no anclados asociados a la superficie celular o indirectamente a través de interacciones con fibrinógeno y receptores de fibrinógeno en la superficie celular. El Plg/Plm de la superficie celular bacteriana está involucrado en cuatro procesos en general; (1) degradación de MEC vía activación de metaloproteasas y plasmina; (2) fibrinólisis vía plasmina; (3) evasión inmune a través de plasmina-mediante la degradación de efectores inmunes, incluyendo componentes del complemento e inmunoglobulinas; (4) adhesión a células del huésped vía interacciones plasminógeno-ligando con receptores de superficie celular del huésped. MEC: matriz extracelular; IgG: inmunoglobulina G; RBC: glóbulo rojo; SAK: estafiloquinasa; SEN:  $\alpha$ -enolasa streptococcal; Ska: estreptoquinasa; tPA: activador de plasminógeno de tipo tisular; uPA; activador de plasminógeno de tipo uroquinasa. Tomada de Sanderson-Smith et al., 2012.

### 1.3 Receptores de Plasminógeno

Los receptores celulares de plasminógeno, son de distribución ubicua, presentan alta afinidad por su ligando, y están altamente expresados en la superficie celular de bacterias, hongos, protozoos, helmintos y células de mamífero. Además, estos receptores poseen en el extremo C-terminal, aminoácidos con carga positiva como lisina o arginina, o bien, un sitio interno de unión a plasminógeno, como el reportado para la enolasa (Bernal *et al.*, 2004;

Ghosh *et al.*, 2011). Por lo general, las proteínas que se han reportado con esta función son llamadas *moonlighting* (Pancholi, 2001; Figuera *et al.*, 2013). Diferentes reportes señalan que las proteínas *moonlighting* tienen la capacidad de aumentar la virulencia en diferentes patógenos, ya que varias de estas enzimas son clave en el metabolismo y son capaces de participar en procesos en los que no se habían reportado su participación; no catalíticos, asociados con la adhesión al huésped (Karkowska-Kuleta and Kozik, 2014; Jeffery, 2018).

### **1.3.1 Receptores de plasminógeno en patógenos: bacterias y hongos**

En bacterias y hongos patógenos, el reclutamiento de proteasas del huésped a la superficie representa un mecanismo particularmente eficaz para aumentar su invasividad. Hasta el momento, en bacterias se han reportado más de 50 proteínas que unen Plg (Ayón-Núñez *et al.*, 2018a), las cuales participan en procesos de invasión en el huésped (Sanderson-Smith *et al.*, 2012). En hongos, el estudio de las proteínas que unen plasminógeno ha sido poco abordado; sin embargo, aproximadamente 30 proteínas han sido identificadas (Ayón-Núñez *et al.*, 2018a).

Enolasa es la proteína más estudiada en ambos grupos de patógenos, siendo una proteína altamente expresada y altamente antigénica. En bacterias, se han establecido diferentes modelos de cómo el plasminógeno participa en la invasión en su huésped. En estreptococos del grupo A, la enolasa ha sido identificada en la superficie en forma octamérica y se ha determinado un modelo de interacción Plg-enolasa (Figura 5A), donde, se observa que la interacción se lleva a cabo por las lisinas de la C-terminal (BS1) y un sitio de unión interno (BS2) de la enolasa, los cuales se unen a los dominios *kringle* del plasminógeno KR1 y KR5, respectivamente (Figura 5B) (Cork *et al.*, 2015). El Plg sufre un cambio conformacional que deja expuesto el sitio de corte de los PAs para que se forme la plasmina.

Por otro lado, la enolasa en hongos solo se ha reportado que tiene la capacidad de unir plasminógeno, lo cual, ha permitido hipotetizar su papel en la patogenicidad.

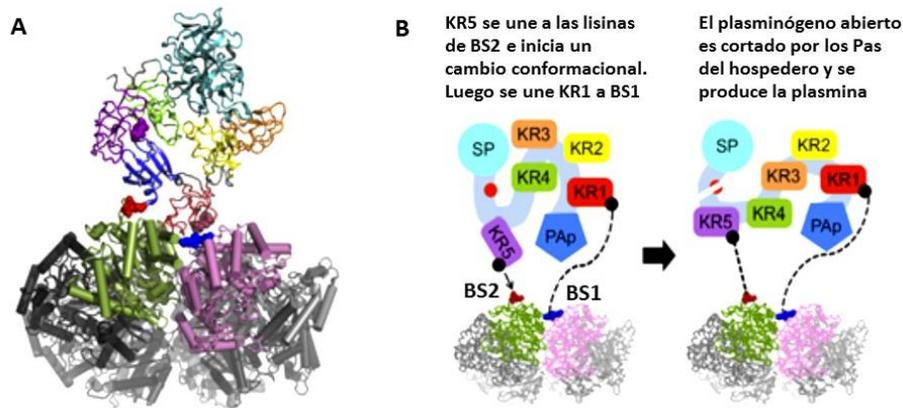


Figura 5. Docking molecular y mecanismo de unión plasminógeno- enolasa en la superficie de *Streptococcus* (SEN). (A) El plasminógeno humano KR1 interactúa en la interface de SEN. Los dominios de plasminógeno se muestran en diferente color: PAp dominio azul; KR1 rojo; KR2 amarillo; KR3 naranja; KR4 verde; KR5 púrpura; dominio serina proteasa (SP) cian. Los parches de tres residuos lineales en KR1 y KR5 implicados en la unión a lisina se muestran como esferas. Un dímero de SEN es de color verde y rosa, respectivamente, con el octámero restante coloreado en tonos de gris. BS1 y BS2 (sitios de unión a plasminógeno en SEM) se muestran como esferas azules y rojas, respectivamente. (B) Modelo propuesto para la unión del plasminógeno por SEN que implica interacciones entre BS1 y KR1, y BS2 y KR5. Sigue el esquema de colores (A). Figura modificada de Cork *et al.*, 2015

### 1.3.2 Receptores de plasminógeno en parásitos: intracelulares y extracelulares

Hasta el momento poco se ha reportado del papel de Plg en parásitos intracelulares. Sin embargo, existen reportes donde han identificado diferentes proteínas con capacidad de unir plasminógeno, entre ellas, la enolasa, lo que podría estar señalando su posible participación en la invasión y migración de ciertos parásitos (Tabla 1).

Tabla 1. Proteínas de unión a plasminógeno en parásitos intracelulares.

Proteínas	Especie de parásito	Características de union	Referencias
Enolasa  LACK	<i>Leishmania mexicana</i>	Muestra una unión heterogénea entre los morfo-fenotipos de promastigotes.  Enolasa une a través de un motivo interno (249AYDAERKMY <sub>257</sub> ).  LACK une a través de un motivo interno similar al de la enolasa (260VYDLESKAV <sub>268</sub> )	(Calcagno <i>et al.</i> , 2002)  (Vanegas <i>et al.</i> , 2007)  (Gómez-Arreaza <i>et al.</i> , 2011)
Enolasa	<i>Plasmodium yoelii</i>	Los ooquistes unen Plg.	(Pal-Bhowmick <i>et al.</i> , 2007)
Enolasa	<i>Plasmodium falciparum</i> <i>Plasmodium berghei</i>	La enolasa de los ooquistes une Plg a través de un motivo interno (DKSLVK).	(Ghosh <i>et al.</i> , 2011)
No Identificada	<i>Trypanosoma cruzi</i>	El tripomastigote y el epimastigote unen Plg en su superficie.	(Almeida <i>et al.</i> , 2004; Rojas <i>et al.</i> , 2008)
No Identified	<i>Trypanosoma evansi</i>	El Plg tiene una mayor capacidad de unión frente a otros organismos de la misma familia.	(Acosta <i>et al.</i> , 2016)
GAPDH	<i>Trichomonas vaginalis</i>	GAPDH nativa y la recombinante unen e inmovilizan Plg, fibronectina y el colágeno.	(Lama <i>et al.</i> , 2009)

Abreviaturas: LACK (*Leishmania* homólogo de receptores para la C-quinasa activada) y GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Por otro lado, el estudio de las proteínas que unen Plg en parásitos extracelulares ha sido ampliamente abordado en los últimos años (Figuera *et al.*, 2013). La mayoría de los parásitos estudiados tienen un estadio en su ciclo de vida que está en contacto con el sistema circulatorio en su proceso de infección, es decir, se encuentran en contacto con proteínas del sistema fibrinolítico del huésped. Los parásitos han desarrollado diferentes estrategias para evadir la respuesta inmunológica del huésped y una de ellas es tomar proteínas para su beneficio, como es el caso del reclutamiento del Plg a la superficie. *Dirofilaria immitis* y *Schistosoma bovis* son los parásitos extracelulares más estudiados con proteínas que unen plasminógeno (Tabla 2). Los gusanos adultos de *D. immitis* pueden sobrevivir durante varios años en el sistema circulatorio de los huéspedes infectados, desarrollando eventos potencialmente mortales como los tromboembolismos, entre otros. Por lo que, los mecanismos parasitarios, como la activación del sistema fibrinolítico, son claves para la supervivencia tanto de los gusanos como del huésped. En un extracto de antígenos de excreción/secreción de gusano adulto de *D. immitis* se identificaron 10 proteínas que unen Plg (González-Miguel *et al.*, 2012), así como, en un extracto de proteínas de superficie de gusanos adultos, se identificaron 11 proteínas, sugiriendo que éstas proteínas interactúan con el sistema fibrinolítico del huésped durante su invasión (González-Miguel *et al.*, 2013).

*Schistosoma bovis* es un parásito hemático de rumiantes que vive por años en los vasos mesentéricos del huésped, incluye también al humano. En un extracto total de proteínas de gusanos de *S. bovis* se identificaron 10 proteínas que unen Plg (Ramajo-Hernández *et al.*, 2007). Recientemente, se reportó que la anexina y que la enolasa recombinante de este parásito, tienen la capacidad de unir y activar Plg, manteniendo la hemostasia alrededor de los gusanos dentro de los vasos sanguíneos de sus huéspedes (de la Torre-Escudero *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2015).

Tabla 2. Proteínas de unión a plasminógeno en parásitos extracelulares.

Proteínas	Especie de parásito	Referencias
Enolasa GAPDH	<i>Onchocerca volvulus</i>	(Jolodar <i>et al.</i> , 2003) (Erttmann <i>et al.</i> , 2005)
GAPDH Anexina B30	<i>Clonorchis sinensis</i>	(He <i>et al.</i> , 2014; Hu <i>et al.</i> , 2014)
Enolasa	<i>Fasciola hepática</i>	(Bernal <i>et al.</i> , 2004)
HSP60, Actina-1/3, Actina, actina 4, Transglutaminasa, GAPDH, Ov87, LOAG 14743, Galectina and P22U  Actina-5C, Actina-1, Enolasa, Fba, GAPDH, Protein domain MSP, MSP 2, Beta-galactosidasa de unión a lectina, Galectina, and Ciclofilina Ovcyp-2	<i>Dirofilaria immitis</i>	(González-Miguel <i>et al.</i> , 2012)  (González-Miguel <i>et al.</i> , 2013)
Enolasa, Actina, GAPDH, ATP: guanidina cinasa, FBA, PGM, Triosefosfato isomerasa, Adenilato cinasa	<i>Schistosoma bovis</i>	(Ramajo-Hernández <i>et al.</i> , 2007)
Enolasa	<i>Echinostoma caproni</i>	(Marcilla <i>et al.</i> , 2007)
Enolasa	<i>Taenia multiceps</i>	(Li <i>et al.</i> , 2015)
Enolasa	<i>Taenia pisiformis</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2015)
Enolasa  Fascicilina-1, Fasciclina-2, MAPK, Anexina, Actina, y cMDH	<i>Taenia solium</i>	(Ayón-Núñez <i>et al.</i> , 2018b; Zhang <i>et al.</i> , 2018) (Ayón-Núñez <i>et al.</i> , 2018b)

Abreviaturas: GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), FBA (Fructosa-bisfosfato aldolasa), PGM (Fosfoglicerato mutasa), MAPK (Proteína quinasa activada por mitógenos) y cMDH (Malato deshidrogenasa citosólica); εACA (ε- aminocaproico ácido).

## 1.4 Enolasa

La enolasa, es una proteína *housekeeping* y constitutiva tanto de eucariontes como procariontes. Conocida como 2-Fosfo-D-glicerato hidrolasa o fosfopiruvato hidratasa, que cataliza la deshidratación del 2- fosfoglicerato para formar fosfoenolpiruvato, en la ruta glicolítica (Figura 6). Esta enzima también puede catalizar la reacción inversa, en la gluconeogénesis, según la concentración de sustratos en el medio (Fletcher *et al.*, 1976; Tovy *et al.*, 2010).

La glicólisis se lleva a cabo en el citoplasma de la célula y convierte la glucosa en fructosa-1,6-bisfosfato, la cual es convertida en intermediarios de 3 carbonos, utilizados para la generación de adenosín trifosfato (ATP), la producción de piruvato y nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) para el ciclo de ácido cítrico (Figura 6). La enzima enolasa, participa en el penúltimo paso de la glicólisis catalizando la deshidratación reversible del 2- fosfo-D-glicerato al fosfoenolpiruvato (Fletcher *et al.*, 1976; Brewer *et al.*, 2003; Chai *et al.*, 2004).

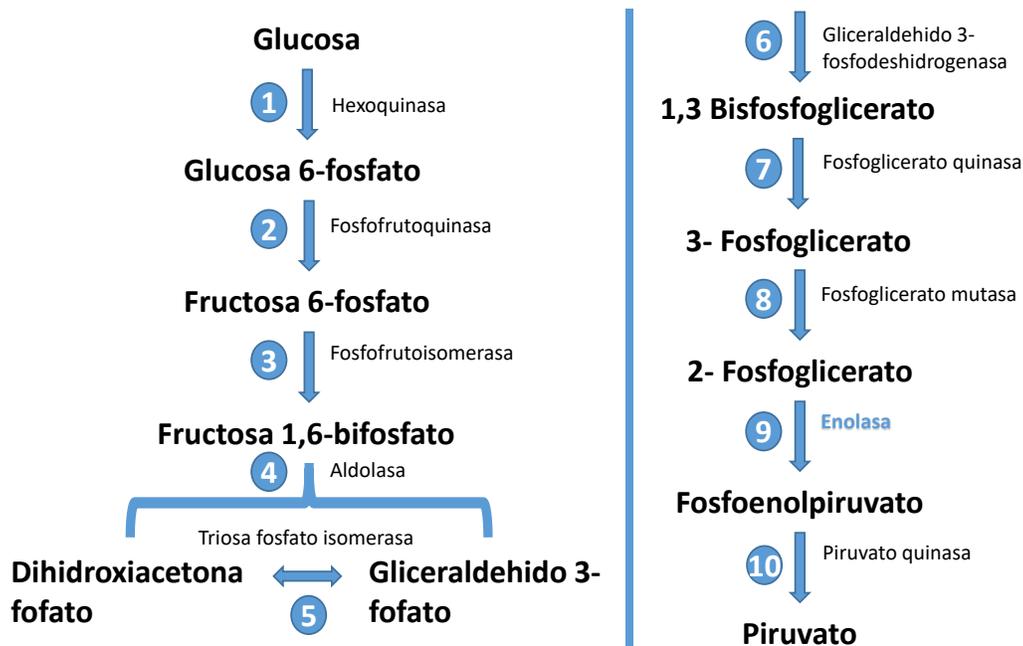


Figura 6. Enolasa en la vía de la Glicólisis. Enolasa participa en la vía de la glicólisis realizando la catálisis de la reacción 9, donde el 2- fosfoglicerato se convierte a fosfoenolpiruvato.

La actividad catalítica de enolasa es dependiente de la presencia de cationes divalentes en el sitio activo de la enzima, preferiblemente magnesio  $Mg^{2+}$ . Aunque otros cationes, como  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe(II)^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  pueden activar a la enzima (en forma decreciente según el orden presentado) para catalizar la reacción e inclusive poseen mayor afinidad por la enzima que el magnesio (Pancholi, 2001).

#### **1.4.1 Estructura de enolasa**

La mayoría de las enolasas caracterizadas hasta el momento tienen un peso molecular de aproximadamente de entre 40 y 50 kDa por subunidad. Normalmente se agregan en dímeros, de peso molecular de entre 80 a 100 kDa, aunque han sido reportadas enolasas octaméricas, compuestas de tetrámeros de dímeros en *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus suis*, y *Streptococcus pyogenes* (Ehinger *et al.*, 2004; Kornblatt *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012).

En vertebrados, la enolasa está codificada por cuatro genes: ENO1, ENO2, ENO3 y ENO4, lo que da como resultado diferentes isoenzimas mediante combinaciones de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Pearce *et al.*, 1976; Schmechel *et al.*, 1978; Ueta *et al.*, 2004). En humanos, se han reportado cuatro isoenzimas de enolasa tejido específicas: enolasa no neuronal ( $\alpha\alpha$  o ENO1), enolasa específica neural ( $\gamma\gamma$  o ENO2), enolasa específica muscular ( $\beta\beta$  o ENO3) y enolasa esperma específica (ENO4) (Edwards and Grootegoed, 1983; Nakamura *et al.*, 2013). En invertebrados, las enolasas han sido poco estudiadas (Tracy and Hedges, 2000), pero se han identificado en parásitos helmintos como *Onchocerca volvulus* (Jolodar *et al.*, 2003), *Fasciola hepatica* (Bernal *et al.*, 2004), *Echinostoma caproni* (Marcilla *et al.*, 2007), *S. bovis* (de la Torre-Escudero *et al.*, 2010), y recientemente en *Taenia multiceps* (Li *et al.*, 2015), *Taenia pisiformis* (Zhang *et al.*, 2015) y *T. solium* (Ayón-Núñez *et al.*, 2018b; Zhang *et al.*, 2018).

#### 1.4.2 Enolasa: proteína de unión a plasminógeno

Como se mencionó anteriormente, en diferentes patógenos se ha propuesto que el Plg/Plm del huésped es capaz de unirse a diferentes proteínas de la superficie del patógeno, degradar coágulos de fibrina y componentes de la matriz extracelular, permitiendo que el patógeno pueda invadir y establecerse en los diferentes tejidos del huésped (Pancholi and Chhatwal, 2003; Sanderson-Smith *et al.*, 2012; Figuera *et al.*, 2013; González-Miguel *et al.*, 2013). Una de las proteínas de unión a plasminógeno más estudiada es la enolasa.

Debido a su participación en diferentes procesos biológicos y dependiendo de su localización en la célula, la enolasa ha sido clasificada como una proteína *moonlighting*, (Pancholi, 2001; de la Torre-Escudero *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2015). Recientemente, en *Taenia pisiformis* y *Taenia multiceps* se reportó que la enolasa une plasminógeno humano (Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). En *T. solium*, la enolasa fue identificada como una de las proteínas que se expresan de manera importante en el cisticerco de *T. solium* (Tsai *et al.*, 2013). También fue una de las proteínas reportadas en el proteoma de las oncosferas activadas (Santivañez *et al.*, 2010). Además, esta proteína ha sido identificada como una proteína de excreción-secreción (Victor *et al.*, 2012), características relevantes de proteínas con capacidad de unir plasminógeno.

## 2. ANTECEDENTES

En un estudio realizado anteriormente en el laboratorio, identificamos y evaluamos la capacidad de enolasa de cisticercos de *T. solium* de unir plasminógeno humano (Ayón-Núñez D.A., 2014, Tesis de Maestría). En este estudio se observó que además de la enolasa, existen diferentes proteínas de *T. solium* con capacidad de unir plasminógeno que no habían sido identificadas (Figura 7).

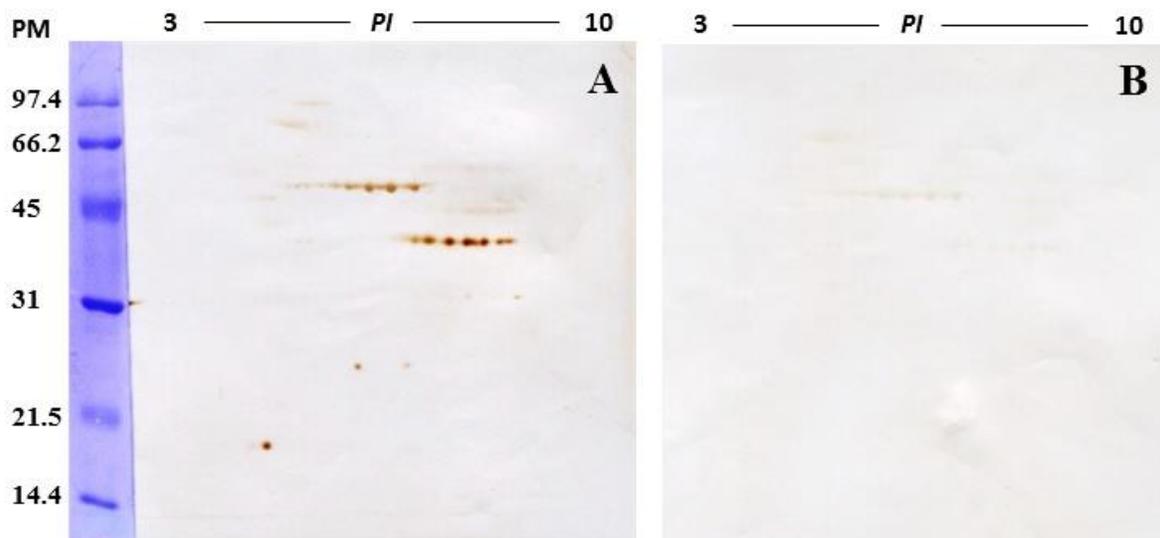


Figura 7. Ensayo de unión al plasminógeno en un extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium* por 2D SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas se incubaron con plasminógeno humano en ausencia (A) o presencia (B) del ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, inhibidor de plasminógeno. (PM) marcadores de peso molecular.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En *T. solium* se han realizado numerosos estudios enfocados en el control, el diagnóstico, su biología y la relación con su huésped (García *et al.*, 2003; Esquivel-Velázquez *et al.*, 2011; Flisser, 2013; Bobes *et al.*, 2014; Navarrete-Perea *et al.*, 2016; Rajshekhar, 2016). Los posibles mecanismos que utiliza el parásito para su invasión y establecimiento en diferentes tejidos del huésped, desde músculo-esquelético hasta del sistema nervioso central, son escasos. Por lo que, estudiar las proteínas de *T. solium* con capacidad de unir plasminógeno y activar plasmina, podría sugerir un mecanismo que coadyuve en la invasión y establecimiento del parásito en los diferentes tejidos del huésped.

#### **4. PREGUNTA**

¿Qué proteínas del cisticerco de *Taenia solium* tienen la capacidad de unir plasminógeno y cuál sería su papel en la invasión del parásito a los diferentes tejidos del huésped?

#### **5. HIPÓTESIS**

*Taenia solium* expresa proteínas que tienen la capacidad de unir plasminógeno y que participan en la invasión de los tejidos del huésped.

#### **6. OBJETIVOS**

##### **6.1 Objetivo general**

Identificar qué proteínas de cisticerco de *Taenia solium* tienen la capacidad de unir plasminógeno y dilucidar su posible participación en la invasión del parásito a los diferentes tejidos del huésped.

##### **6.2 Objetivos específicos**

1. Identificar y caracterizar las diferentes proteínas que unen plasminógeno humano en cisticerco de *T. solium*.
2. Seleccionar y expresar algunas de las proteínas que unen plasminógeno con base en las reportadas en el proteoma de las oncosferas activadas.
3. Evaluar si la enolasa recombinante tiene la capacidad de unir y activar plasminógeno humano.
4. Identificar qué isoformas de enolasa expresan los cisticercos aislados de músculo esquelético y de cerebro de cerdos infectados naturalmente

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Obtención de cisticercos de *Taenia solium*

Los cisticercos de *T. solium* se obtuvieron de músculo esquelético y cerebro de cerdos infectados naturalmente (proporcionados por la Doctora Nelly Villalobos, del departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, UNAM). Los cisticercos se lavaron cuatro veces con PBS 1X (pH 7.4), algunos se mantuvieron en congelación a - 70 °C y otros se fijaron en paraformaldehído al 10%.

### 7.2 Obtención de extracto soluble de proteínas

Se preparó un extracto soluble de proteínas totales de cisticercos de *T. solium* utilizando un buffer de lisis (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 10 mM tris, 12.5 mM EDTA) con inhibidores de proteasas (12 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM leupeptina, 0.3 μM pepstatina A). Brevemente, los cisticercos se colocaron en un tubo de 1.5 ml y se les agregó buffer de lisis 1:3 (volumen/peso). Posteriormente, se maceraron de manera mecánica. El macerado se incubó en hielo durante 10 min y después se centrifugó a 14 000 x g por 15 min. El sobrenadante se recuperó (extracto soluble de proteínas) descartando el pellet. Por último, las proteínas del extracto se cuantificaron con el kit colorimétrico 2-D Quant (GE Healthcare Life Sciences, Amersham-UK), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 7.3 Separación de proteínas solubles por electroforesis en doble dimensión (2D-SDS-PAGE)

Para separar las proteínas de *T. solium* que unen plasminógeno humano se realizaron geles 2D-SDS-PAGE con el fin de realizar un ensayo de *ligand blotting*. Para la primera dimensión, 150 μg de extracto de proteínas de cisticercos se resuspendieron en buffer de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS, 0.86 M DTT, 2 % de anfólicas y 0.1 % de azul de bromofenol) a un volumen final de 125 μl. Posteriormente, una tira IPG no lineal de 7 cm con

gradiente inmovilizado de pH 3-10 (BioRad, CA-USA, Cat. 163-2002) se rehidrató con el extracto durante 16 hrs. Las tiras fueron cubiertas con 1 ml de aceite mineral DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare Life Sciences, Amersham-UK Cat. 17133501) para evitar la evaporación de la muestra. El isoelectroenfoque se realizó por electroforesis horizontal en un sistema Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories Cat. No. 165-4000) con las siguientes condiciones: temperatura 20 °C; máximo 50  $\mu$ A/tira; paso 1, 250 V por 20 min; paso 2, 4 000 V por 2 h; y paso 3, 4 000 V por seis horas hasta que alcanzaron los 10 000 V. Una vez terminado el IEF, las tiras se retiraron del equipo y se eliminó el exceso de aceite. Para realizar la segunda dimensión, las tiras se incubaron en 10 ml de solución de equilibrio (1 % DTT, 6 M urea, 50 mM Tris-Cl pH 8.8, 30 % glicerol, 2 % SDS y 0.1 % de azul de bromofenol) por 15 min, transcurrido el tiempo se incubaron en 10 ml de solución de equilibrio (2.5 % iodoacetamida, 6 M urea, 50 mM Tris-Cl pH 8.8, 30 % glicerol, 2 % SDS y 0.1 % azul de bromofenol) por 15 min. Las tiras se colocaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS al 12%. Las proteínas se separaron por peso molecular a una diferencia potencial constante de 200 volts. Por último, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad CA-USA, Cat. 1620177).

#### **7.4 Ligand blotting de plasminógeno humano**

Para realizar este ensayo, se utilizaron las membranas de PVDF transferidas. El Plg humano (Roche Germany, Cat. 10874477001) se preparó en una solución de BSA al 3% w/v en buffer PBS con 0.05% del detergente Tween20 (Sigma-Aldrich St. Louis-USA, Cat. 1706531) (PBS-T). Cada membrana se incubó con Plg 1:500  $\mu$ g/ml durante 1 h a temperatura ambiente en presencia o ausencia de 500 mM  $\epsilon$ ACA (Sigma-Aldrich St. Louis-USA, Cat. A2504). Después, se realizaron tres lavados a la membrana con PBS-T para eliminar el Plg unido inespecíficamente. Se incubó nuevamente durante 1 hr a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal comercial producido en cabra contra Plg humano (anti-Plg) (Acris antibodies Germany, Cat. R1598) diluido 1:1000 en la solución de BSA PBS-T. Se lavó nuevamente con PBS-T y se incubó posteriormente con el anticuerpo secundario Anti-IgG de

cabra policlonal (Sigma-Aldrich St. Louis-USA, Cat. A5420) diluido 1:3500. Posteriormente, la membrana se incubó con una solución de revelado que contenía 1  $\mu$ l/ml de peróxido de hidrógeno al 30% en PBS-T y 0.4 mg/ml de 3-3 diaminobencidina (Sigma-Aldrich St. Louis-USA, Cat. D8001). Tres ensayos se realizaron en presencia y ausencia de  $\epsilon$ ACA ( $\epsilon$ -ácido aminocaproico/análogo de lisina) que es un inhibidor competitivo de plasminógeno.

### 7.5 Identificación de proteínas que unen Plg por espectrometría de masas MS/MS (MALDI TOF/TOF)

Los puntos identificados en el *ligand blotting*, fueron cortados manualmente de los geles. Posteriormente, fueron desteñidos con ACN: NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM (50:50 v/v). La digestión proteica se llevó a cabo durante 18 horas a 37 °C con tripsina grado masas (Promega USA, Cat. V528A). Los péptidos obtenidos de la digestión se extrajeron (ACN: H<sub>2</sub>O: ácido fórmico 50:45:5 v/v), y se disminuyó el volumen de la muestra en un concentrador (Eppendorf Hamburg-Germany, 5301). La muestra se desaló utilizando una columna C18 (EMD Millipore, ZipTipC18). Posteriormente, las muestras se colocaron por sextuplicado en la placa utilizando como matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamínico. Por último, las muestras se analizaron en un MALDI TOF/TOF 4800.

Para la identificación de las proteínas, con los espectros de MS/MS obtenidos se realizó una búsqueda con el algoritmo de búsqueda Paragon del software ProteinPilot (<http://www.uniprot.org>), con un porcentaje de confianza del 66%.

### 7.6 Análisis bioinformático de las isoformas de enolasa de *T. solium*

Con el fin de identificar las isoformas de enolasa, se realizó una búsqueda extensiva en el genoma de *T. solium*, utilizando la base de datos GeneDB (<http://www.genedb.org/homepage>).

Para dar continuidad a la identificación de las isoformas, se realizaron alineamientos de las secuencias de enolasa de organismos relacionados a *T. solium*, obtenidas de las bases de datos disponibles en GenBank y GeneDB. Los alineamientos se realizaron utilizando herramientas bioinformáticas (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Además, se realizó un estudio filogenético con 77 secuencias de aminoácidos de enolasas de 46 organismos diferentes. Las secuencias se descargaron de las bases de datos GenBank y GeneDB (<http://www.genedb.org/homepage>). Las secuencias de enolasa de *T. crassiceps* se obtuvieron de una base de datos no publicada. Utilizando el software Clustal W se alinearon las secuencias (Thompson et al., 1997).

Para el estudio filogenético, donde se incluyeron las secuencias seleccionadas, se realizó un análisis de máxima verosimilitud (ML) utilizando el software RAxML v.7.0.4. (Stamatakis, 2006). Se seleccionó el modelo de sustitución GTRGAMMAI para los análisis de ML, con 10.000 réplicas de bootstrap.

### 7.7 Expresión de las isoformas de enolasa de cisticerco. RT-PCR

Para iniciar la caracterización de las enolasas de *T. solium*, primero se estudió la expresión de las isoformas identificadas por RT-PCR. Para ello, RNA total de cisticerco de *T. solium* se purificó con Trizol-cloroformo (Invitrogen™), siguiendo las indicaciones del comerciante. Oligonucleótidos específicos se diseñaron basados en las secuencias de nucleótidos de TsEno1 (previamente diseñados en Ayón-Núñez et al., 2018), TsEno2, TsEno3, y TsEno4 (Tabla 3). Los oligonucleótidos se diseñaron con 15 bases complementarias del vector PET23a incluyendo las enzimas de restricción, con el fin de utilizarlos posteriormente para la clonación, utilizando el kit In-Fusion® HD Cloning. Se realizó la retrotranscripción del RNA, una vez obtenido el cDNA, se amplificaron los genes de enolasa por PCR con la HotStar® Taq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) bajo las siguientes condiciones: Activación inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 60 s, alineamiento por 15 s a 64 °C para Eno1, 58 °C para Eno2 y Eno4, 60 °C para Eno3, y extensión

final a 72 °C por 60 s. Los amplicones fueron resueltos en geles de agarosa al 1% para su visualización.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos para la amplificación (PCR) de las isoformas de enolasa.

TsEno1	Fw: 5'AATGGGTCGC/GGATCC/ATGTCCATCCAAAAGATTCATGC Rev: 5'TGCTCGAGT/GCGGCCGC/CAAAGGATTGCGGAAGTGCTC
TsEno2	Fw: 5'AATGGGTCGC/GGATCC/ATGGCGATGCTAAGAATTGTG Rev: 5'TGCTCGAGT/GCGGCCGC/TTTGATAGGGTTTAATATGTGC
TsEno3	Fw: 5'AATGGGTCGC/GGATCC/ATGAAATCTATCATTGCACGCC Rev: 5'TGCTCGAGT/GCGGCCGC/AGGATGGCGGAAATTTTCGC
TsEno4	Fw: 5'AATGGGTCGC/GGATCC/ATGAAACAACAGTTCGATAATG Rev: 5'TGCTCGAGT/GCGGCCGC/CTCACATTTACCCAGAGG

### 7.8 Clonación, expresión y purificación de las enolasas de *T. solium*

Se procedió con la clonación de cada enolasa amplificada: TsEno1, TsEno3 y TsEno4. Para ello, se utilizó el kit “In-Fusion® HD Cloning Kit” (Clontech® Laboratories, Inc. CA-USA, Cat. 639649) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, los genes de interés se amplificaron con los oligonucleótidos previamente diseñados, utilizando la polimerasa CloneAmp™ DNA del kit a 98°C 10 seg, 55 °C 15 seg y 72°C 10 seg, 35 ciclos, a la temperatura requerida para cada par de oligonucleótidos . La clonación se realizó utilizando el Protocolo-II especificado en el Kit (Clontech® Laboratories, Inc). Después, las células competentes “Stellar™ Competent Cells” *E. coli* HST08 se transformaron con 1 µl de la reacción de clonación antes realizada siguiendo el protocolo PT5055-2 (Clontech® Laboratories, Inc). Posteriormente se sembraron en placas con medio LB (Luria-Bertani) más ampicilina y se incubaron a 37 °C toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación, se seleccionaron cuatro colonias al azar y se purificó el plásmido (PET23a-TsEno). Los plásmidos se analizaron en geles de agarosa al 1% y se enviaron a secuenciar con oligonucleótidos específicos para el vector PET23a.

Las células competentes *E. coli* XL-Blue se transformaron con el PET23a-TsEno. Se indujo la expresión en presencia de 1mM de IPTG a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6 y 24 h) a 37 °C. Por último, las enolasas recombinantes de *T. solium* (rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4) se purificaron por cromatografía líquida en el equipo ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala-Suecia) por columna de afinidad a níquel (GE Healthcare Life Sciences, Amersham-UK Cat. 17524701).

### 7.9 Ensayo de unión a plasminógeno humano en microplaca

Microplacas de poliestireno (Corning Costar, Sigma-Aldrich) se recubrieron con 1 µg de rTsEnoA, rTsEnoC, rTsEno4 o 3 µg de CE por pozo mediante incubación durante toda la noche a 4 °C, utilizando un buffer de bicarbonato / carbonato 0,05 M, pH 9,6. Luego, las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se bloquearon con PBS-T- 1% de gelatina (PBS-T-Gel) durante 1 hora a 37 ° C. Después se realizó otro lavado, luego se incubaron con 4 µg de Plg humano durante 1 h. Pasado el tiempo de un nuevo se realizaron lavados y se incubó durante 1 h con antisuero anti-Plg policlonal de cabra (Acris Antibodies) 1: 1000. Posteriormente de hacer lavados, los pozos se incubaron durante 1 h con anticuerpo policlonal IgG anti-cabra conjugado con peroxidasa (Sigma) 1: 1500. La actividad de la peroxidasa se reveló con 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); La reacción se detuvo agregando 100 µl de ácido clorhídrico 1N y se midió en un espectrómetro a una D.O. de 450 nm. El ensayo se realizó en presencia y ausencia de 40 mM de εACA. El ensayo se realizó por triplicado.

### 7.10 Ensayo de activación de plasminógeno con rTsEnoA en solución

Para evaluar si el plasminógeno humano se activa en presencia de la rTsEnoA, se midió la actividad de la 4-nitroanilina de la plasmina generada en solución usando el activador de plasminógeno tipo tisular (tPA). En placas de microtitulación (Thermo Scientific, Cliniplate Labsystem, Cat. 28298-602) se incubaron 10 µg de rTsEnoA en 100 µl de 4 µg de

plasminógeno por 1 h a 37°C. Posteriormente, a cada pozo se le adicionó 1.5 µg/mL de tPA (Calbiochem, Cat. 612200) y 0.4 mM de chromozym PL (Roche Germany, Cat. 10378461001) ajustado a un volumen final de 200 µl con 50 mM de Tris buffer pH 7.4. La reacción se midió a una densidad óptica (D.O.) de 405 nm a temperatura ambiente durante 24 h. El ensayo se realizó en presencia y ausencia de εACA, con los diferentes controles, en ausencia de rTsEnoA, plasminógeno, tPA y chromozym PL.

#### **7.11 Medición de la actividad enzimática de rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4**

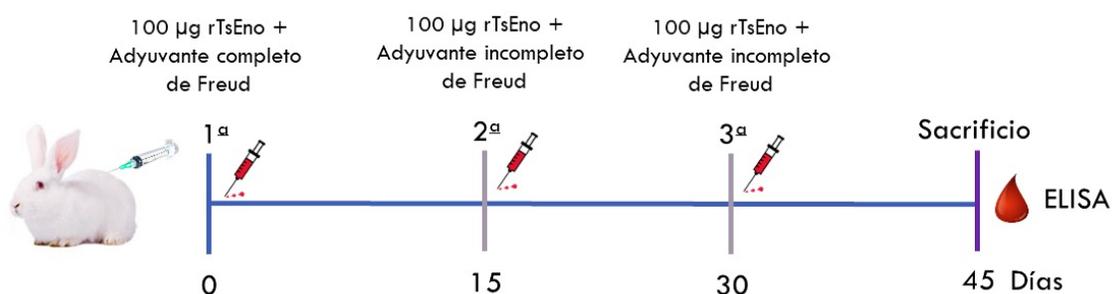
Este estudio se realizó con el fin de determinar si las enolasas recombinantes de *T. solium* (rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4) tenían la actividad enzimática característica y/o había diferencia entre ellas.

La actividad se evaluó por reacción directa, dando lugar a la formación del fosfoenolpiruvato acoplado con piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa. Donde se cuantifica la oxidación de NADH y la producción de NAD. Para evaluar la actividad enzimática, se realizaron cinco cultivos independientes de bacterias de 500 mL, utilizando las condiciones ya establecidas (Saavedra *et al.*, 2005). Después, la proteína se purificó de manera independiente de cada cultivo y se guardó a -70 °C en glicerol al 50%. La reacción se realizó en presencia de buffer pH 7.0 (50mM de imidazol; Mes, Tris, 10mM de acetato, pH 7 a 37°C), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NADH, 10 µl pK-LDH, 0.1 mM ADP, proteína recombinante (rTsEnoA, rTsEnoC o rTsEno4) y la reacción inicia cuando se agrega 1 mM 2PG. Por último, la actividad enzimática de las enolasas se midió en un espectrofotómetro.

#### **7.12 Producción de anticuerpos anti-rTsEnoA, anti-rTsEnoC y anti-rTsEno4**

Para la producción de anticuerpos policlonales en contra de rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4 de *T. solium*, se inmunizaron conejos (New Zealand, de 2-3 meses y de 2-3 kg) con cada proteína recombinante. Se realizaron tres inoculaciones, la primera con adyuvante completo de Freud y dos con adyuvante incompleto de Freud (Figura 8). Preparación del inóculo: previamente,

las proteínas recombinantes se dializaron en PBS 1X y se cuantificaron. 100 µg/mL de las proteínas recombinantes se homogenizaron en una dilución 1:1 con el adyuvante manteniendo la mezcla a 4°C. Antes de inmunizar a los conejos se le extrajeron 3 mL de sangre, con el propósito de obtener el suero preinmune (se almacenó a -70 °C). El primer inóculo con el adyuvante completo de Freud se realizó por vía intradérmica en la nuca con una jeringa de 5 mL. Las siguientes dos inoculaciones se realizaron de la misma manera pero con adyuvante incompleto de Freud. Por último, obtuvimos una muestra de sangre de los conejos para evaluar los títulos de anticuerpos por ELISA. Finalmente, los conejos fueron sangrados a blanco, se separó el suero y se almacenó a -70 °C. Todos los procedimientos de inmunización fueron realizados por médicos veterinarios de la Unidad de Modelos Biológicos, del IIB.



**Figura 8. Esquema de inmunización.** Los conejos fueron inmunizados con 100 µg de rTsEnoA, rTsEnoC o rTsEno4 con adyuvante completo e incompleto de Freud.

### 7.13 Inmunolocalización de enolasa en cisticerco de *Taenia solium*

Con la finalidad de conocer la localización de enolasa en el cisticerco de *T. solium*, los cisticercos previamente fijados en paraformaldehído se incluyeron en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 3 micras de grosor. Los cortes de tejido se desparafinaron incubándolos a 50 °C por 30 min., y se deshidrataron en graduaciones decrecientes de alcoholes. Posteriormente, los cortes de tejido se bloquearon con 1 % de albumina sérica bovina (BSA) en PBS 1% con 0.05 % de Tween20 por 10 min e inmediatamente se incubaron con anticuerpo anti-enolasa policlonal hecho en cabra 1:50 (Santa Cruz, CA-USA, Cat. Sc-

7455) o anti- $\alpha$ -enolasa monoclonal 1:50 por 1 h y/o anti-rTsEnoA policlonal producido en conejo 1:10 por toda la noche.

Transcurrido el tiempo de incubación, los cortes se lavaron tres veces con PBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG peroxidado (correspondiente para cada anticuerpo primario) 1:1000 a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, los cortes de tejido fueron revelados usando 3 mg/mL de 3,3-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich St. Louis-USA, Cat. D8001) en PBS-Tween y 30% de peróxido de hidrogeno diluido 1:1000 y contrateñidos usando hematoxilina. Todos los cortes de tejido se fijaron con resina sintética, para ser visualizados en el microscopio. Como control, en paralelo, cortes de tejido se incubaron en ausencia del anticuerpo primario.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Identificación de las proteínas de *T. solium* que unen plasminógeno humano

La identificación de las proteínas de cisticerco de *T. solium* que unen plasminógeno humano (Figura 9A) se realizó por MS/MS (MALDI TOF/TOF). Se identificaron siete proteínas: Fasciclina-1, Fasciclina-2, enolasa, proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), anexina, actina y la malato deshidrogenasa citosólica (Tabla 4). No se lograron identificar 5 puntos del 2D-SDS-PAGE (17, 18, 19, 20 y 21, Figura 9A) debido a la baja concentración de proteína obtenida.

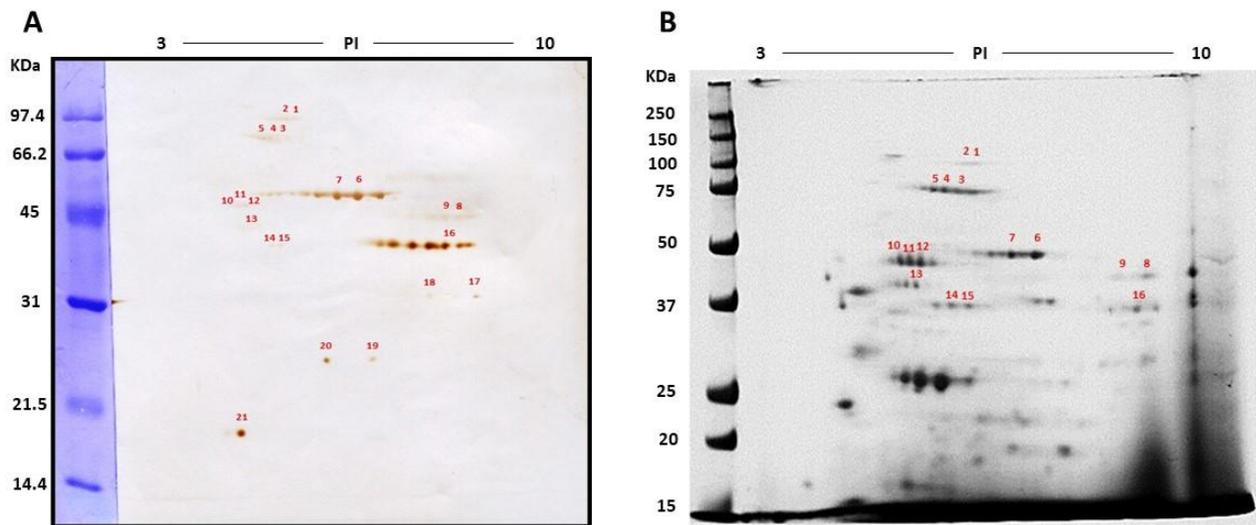


Figura 9. Identificación de las proteínas que unen plasminógeno por MS/MS (MALDI TOF/TOF). A) Ensayo de unión a plasminógeno (*ligand blotting*). B) 2D-SDS-PAGE de extracto de proteínas de cisticerco de *T. solium*, revelados con azul de Coomassie. Los números representan los puntos que se enviaron a identificar.

**Tabla 4.** Proteínas de *Taenia solium* que unen plasminógeno humano.

Proteína	No. en Fig. 9	No. de acceso	% Cobertura	No. de Péptidos	Péptidos
Fasciclina 1	1	Ts_000855200	17.9	13	YEGHPTLAENFAK; LEAIAASHVSAGLK; YGGNSQAVGYHIAK; AFASKPTEIAR; IFEDVPIEGHEH; ELEFDYR; QVDEEYR; FYTITAPTSDSWSSLR; IGYDELPR; NLYLVTTDDGWIDPR; NNYLYETTYFTK; SGLIHIIIR; VVEYNIPGR
Fasciclina 1	2	Ts_000855200	21.4	14	YEGHPTLAENFAK; IGYDELPR; NNYLYETTYFTK; DIFEDVPIEGHEH; ELEFDYR; EQLEAIAASHVSAGLK; FQVDEEYR; FYTITAPTSDSWSSLR; HNGNLNIPDFSGHTDGHR; IYGGNSQAVGYHIAK; NLYLVTTDDGWIDPR; QNGQPYTIFVPLPEGGGDLDR; SGLIHIIIR; VVEYNIPGR
Fasciclina 2	3	Ts_000825900	8.4	4	DFTVVFPEQDTSSQTIR; EPDISNLIVDGR; AGFGSILNR; DKENAYGPGQLR
Fasciclina 2	4	Ts_000825900	10.5	4	DFTVVFPEQDTSSQTIR; GALDCLANGDPPELR; LQDDPDLAFTADIPTDLR; EPDISNLIVDGR
Fasciclina 2	5	Ts_000825900	8.5	3	DFTVVFPEQDTSSQTIR; GALDCLANGDPPELR; LQDDPDLAFTADIPTDLR
Enolasa	6		76.44	14	ND
Enolasa	7		54.97	13	ND
Mitogen activated protein kinase kinase (MAPK)	8	Ts_000212400	10.6	6	YNQLLR; AGTVTGTMRMFAPEL; FPIVIFLGSLSFL; GDREKALSIK; IADFGASKRLGGLIRK; LITKDDLWRLGLR; LLKSTIRNATVTPNPK; QVAKPDETPAEAEPLR; RLGLLR; RNAYPLR; SLSLNDVLAPALGVGK; TISAGQRMHLETGRHVPPR; VDRETLKDDDELREKLK
Mitogen activated protein kinase kinase (MAPK)	9	Ts_000212400	3.9	8	YNQLLR; ALNRRNGKQDR; LGLRGGSVLRIWGAVCNLR; QVAKPDETPAEAEPLR; RLGLLR; WRLGLR
Anexina	10	trjQ4ZGZ6	17.4	5	VLSRIVLNSK; CFNANEDAQELEK; DPIGTVADMILYR; ETSGDYKVLVSR; IILAHSEDLNR
Fasciclina 1	11	trjX2D553	15.1	13	LVSPPEAR; RLVSPPEAR; HIIRHPLPR; ASKPTEIAR; HPLLPRSGLNMDK; KNLYLVTTDDGWIDPR; KVIDSCGETHEFIDK; NGNLANIPDFSGHTDGHR; PLLPRSGLNMDK; QLGRKLVSPPEAR; SGLGNMDKSSVMSLLR; SSVMSLLRNPETR; YEGHPTLAENFAK
Anexina	12	trjQ4ZGZ6	26.1	7	VLSRIVLMSK; SMKGAGTKDDSLIRI; AHVNAAAALQKAMK; AQYKDLKER; CFNANEDAQELEK; GIGTDEATIIDLANR
Anexina	13	trjQ4ZGZ6	6.8	2	VLSRIVLMSK; KRVLVALLQAR
Actina	14	spjP68555	17.8	5	QEYDESGPGIVHR; SYELPDGQVITIGNER; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; GYSFTTTAER; AGFAGDDAPR
Actina	15	spjP68555	20.2	6	QEYDESGPGIVHR; SYELPDGQVITIGNER; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; GYSFTTTAER; AGFAGDDAPR; AVFPSIVGR
Malato deshidrogenasa citosolica	16	Ts_000048200	23.7	7	IILHLLDIPEAK; QFPDLAHAVVTK; NVCIWGNHSNK; AIVDQMHDDWVFGTK; ITADELVDER; PDLAHAVVTKGGK; VLVVGNPANTNCLIMSK

Como parte de uno de los objetivos de este trabajo, se seleccionó la enolasa para ahondar en su evaluación, porque ya habíamos observados en estudios previos, que la proteína del cisticerco de *T. solium* une plasminógeno (Ayón-Núñez D.A., 2014, Tesis de Maestría). Además, fue una de las proteínas identificadas en el proteoma de las oncosferas activadas, lo que sugiere que participa en el proceso de migración del parásito a los diferentes tejidos del huésped. Por otro lado, ya se ha demostrado que la enolasa está involucrada en la migración de diferentes patógenos. Además, se seleccionaron dos proteínas más: la fasciclina 2, la cual, se clonó y expresó (Figura suplementaria 1) y la malato deshidrogenasa

citoplasmática (previamente clonada en el laboratorio). Sin embargo, debido a que es complicada su expresión y purificación, se decidió enfocar el estudio en la proteína enolasa.

## 8.2 Caracterización de las isoformas de enolasa de *Taenia solium*

En vertebrados se han identificado cuatro genes de enolasa (Eno1, Eno2, Eno3 y Eno4) que dan lugar a diferentes isoformas (alfa-enolasa, beta-enolasa, gama-enolasa y Eno4). Sin embargo, en invertebrados no han sido caracterizadas las isoformas de enolasa. Realizando una búsqueda en el genoma de *T. solium* y gusanos relacionados (*T. crassiceps*, *E. multilocularis*, *E. granulosus*), encontramos cuatro isoformas de enolasa: Eno1, Eno2 y Eno3, con un porcentaje de identidad entre ellas mayor al 65%; y Eno4 más pequeña (26 % de identidad) y que solo conserva los sitios de unión a sustrato, característica que la define como enolasa. Para *T. solium*, Eno1 es la proteína que hemos estado evaluando en este estudio y está conformada por 433 aa. Por su parte, Eno2 contiene 438 aa, Eno3 450 aa y Eno4 250 aa (Figura 10).

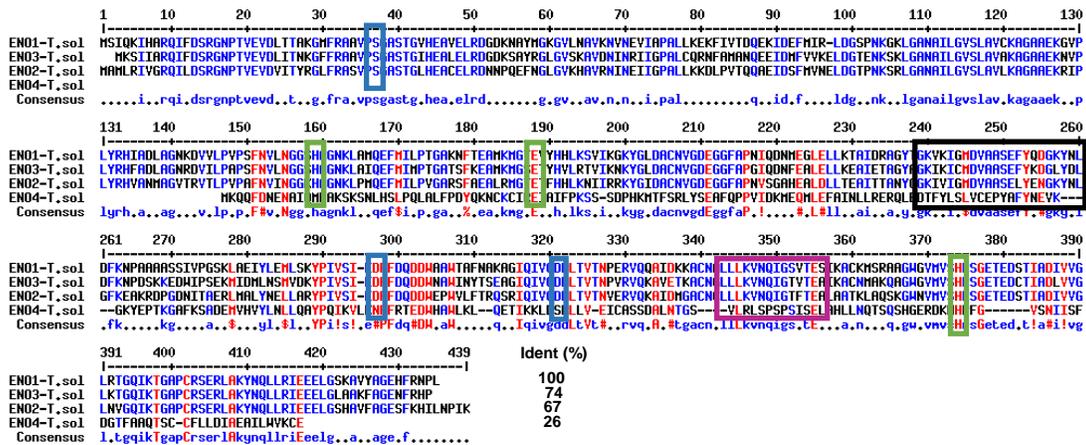


Figura 10. Alineamiento de las isoformas de enolasa identificadas en el genoma de *T. solium*. El recuadro en negro, indica el motivo putativo que une a plasminógeno; en rosa el motivo que caracteriza la proteína; el recuadro azul muestra los motivos de unión a  $Mg^{2+}$  y en el recuadro verde los motivos de unión a sustrato. Las secuencias, de color rojo indican los aminoácidos idénticos, y de color azul los aminoácidos que difieren entre las secuencias. Ident (%): porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos con respecto a Eno1.

Con el fin de conocer sí las isoformas de enolasa identificadas en el genoma de *T. solium* son homólogas a las isoformas descritas en vertebrados, se realizó un análisis filogenético con enolasas de diferentes organismos. Se incluyeron 77 secuencias de aminoácidos de enolasas de 46 organismos diferentes, secuencias de bacterias, hongos, arqueobacterias, vertebrados ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y Eno4), así como 19 secuencias de aminoácidos de 7 especies de gusanos (Figura 11).

Los resultados del análisis filogenético demostraron que las secuencias de aminoácidos de las isoformas de Tenias, con la excepción de Eno4 no son ortólogos de las isoformas de vertebrados. Por lo tanto, el origen de las variantes de secuencias de aminoácidos en vertebrados e invertebrados no son monofiléticos. Las isoformas alfa, beta y gama de vertebrados, no corresponden a Eno1, Eno2 y Eno3 de invertebrados. Además, claramente se observa que la Eno4 pareció ser la más ancestral. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió nombrar a las proteínas de este grupo de parásitos como: EnoA, EnoB, EnoC, conservando la Eno4 con el mismo nombre para vertebrados (Figura 11). Para el caso de *T. solium*, se le agregó Ts al inicio de la abreviatura: TsEnoA, TsEnoB, TsEnoC y TsEno4.

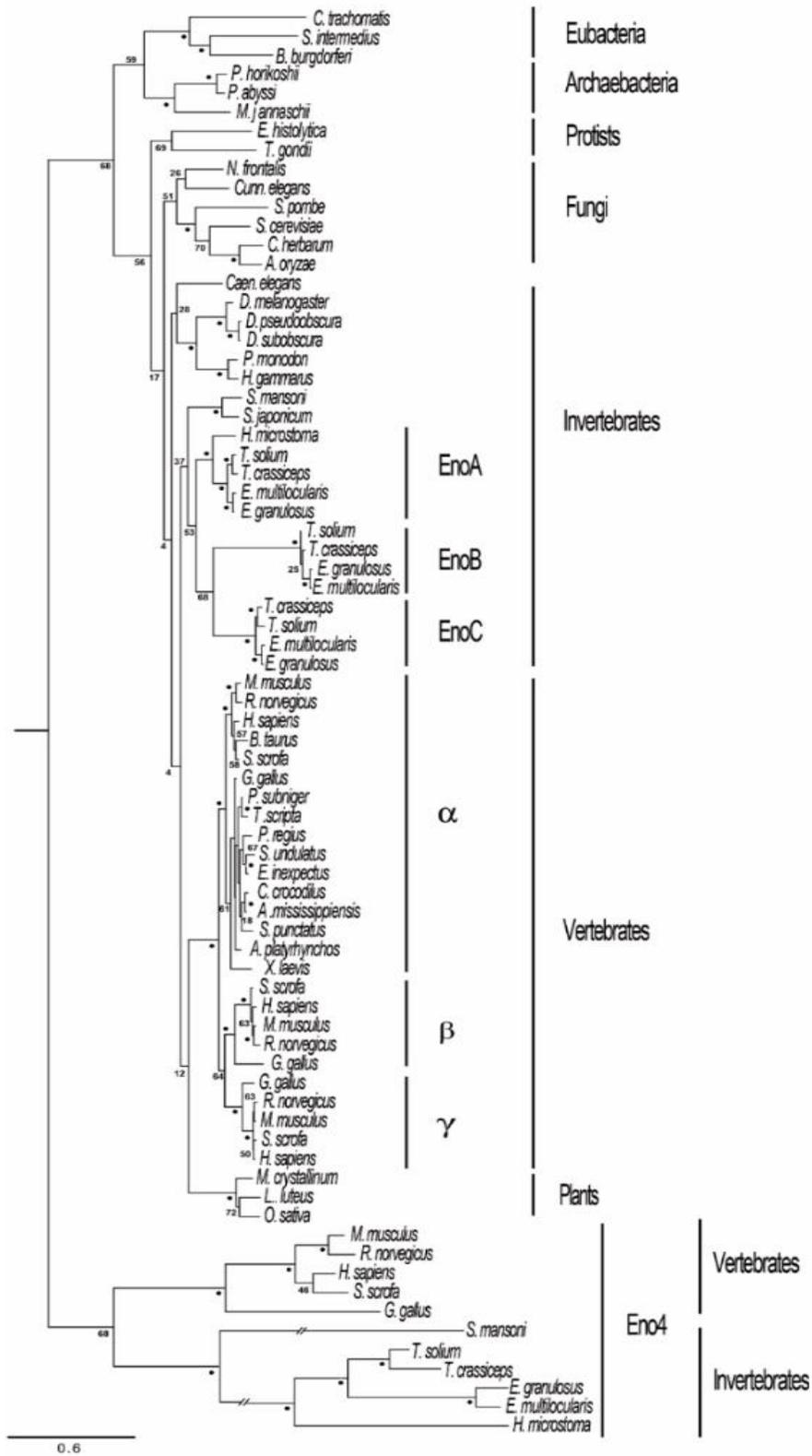


Figura 11. Árbol filogenético de enolasa incluyendo las enolasas de *Taenia solium*. Se usó una distancia corregida gamma ( $\alpha = 1,05$ ) con el método de *neighbor-joining*.

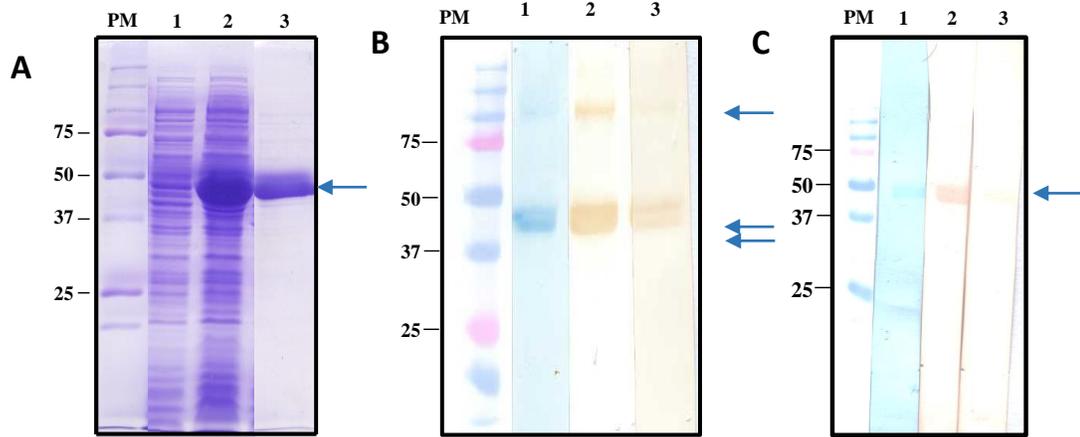
### 8.3 Evaluación de la capacidad de la enolasa recombinante de *T. solium* (rTsEnoA) de unir y activar plasminógeno humano

Para evaluar la capacidad de unión y activación del plasminógeno humano de la enolasa recombinante de *T. solium* A (rTsEnoA), primero se indujo con 1mM de IPTG, encontrándose la máxima expresión a las 6 h de tratamiento, como previamente se describe (Ayón-Núñez D.A., 2014, Tesis de Maestría). Posteriormente, la rTsEnoA se purificó por afinidad a columnas de Niquel obteniéndose 10 ml con una concentración de 690 µg/ml (Figura 12A).

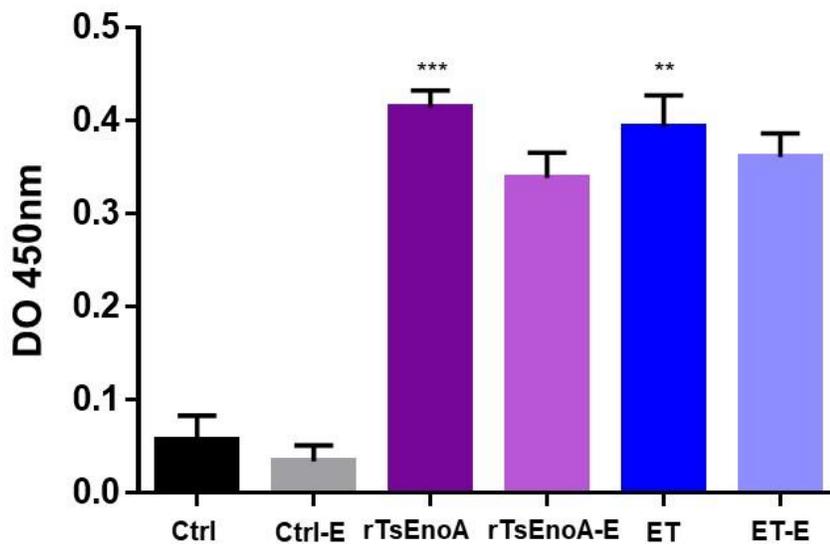
Se observó que la proteína purificada correspondía a la rTsEnoA por Western blot con anticuerpos anti-histidina y anti-enolasa comerciales (Figura 12B, línea 2 y 3 respectivamente). En la figura, se observan tres bandas, una de 47 kDa (peso molecular esperado), otra de 40 kDa y otra más de 100 kDa, aproximadamente.

En seguida se evaluó si la rTsEnoA une plasminógeno humano mediante *ligand blotting* en presencia y ausencia de εACA (Figura 12C). El *ligand blotting* mostró que la rTsEnoA une plasminógeno humano (Figura 12C, línea 2) y que la unión es inhibida en presencia de εACA (Figura 12C, línea 3).

La unión del plasminógeno a la enolasa recombinante de *T. solium* se confirmó mediante ELISA (Figura 13- barra lila). Sin embargo, la inhibición en presencia de εACA fue de 25% con respecto a la unión de plasminógeno (Figura 13- barra lila claro). El ELISA se realizó con extracto soluble de proteínas de cisticerco de *T. solium* como control positivo y con gelatina como control negativo en presencia y ausencia de εACA.

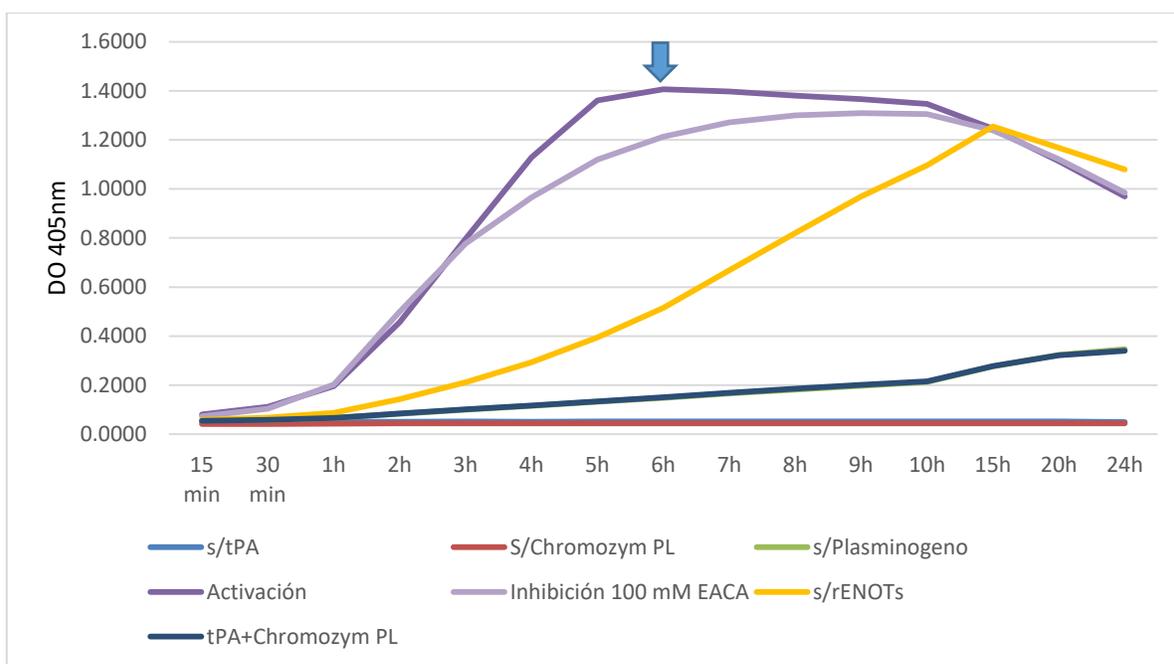


**Figura 12.** Enolasa recombinante de *Taenia solium*. **A)** rTsEnoA purificada. Línea 1, BL21 inducidas al tiempo cero. Línea 2, inducción a las 6 horas. Línea 3, rTsEnoA purificada. **B)** Western Blot anti-histidina 1:4000 y anti-enolasa 1:700. Línea 1, rTsEnoA purificada teñida con Coomassie. Línea 2, western blot anti-histidina 1:4000. Línea 3, Western blot anti-enolasa 1:700. **C)** Ensayo de unión a plasminógeno con rTsEnoA. Línea 1, rTsEnoA purificada teñida con Coomassie. Línea 2, *Ligand blotting*. Línea 3, *Ligand blotting* en presencia de  $\epsilon$ ACA. PM, marcador de peso molecular en kDa. Flechas azules señalando la rTsEnoA.



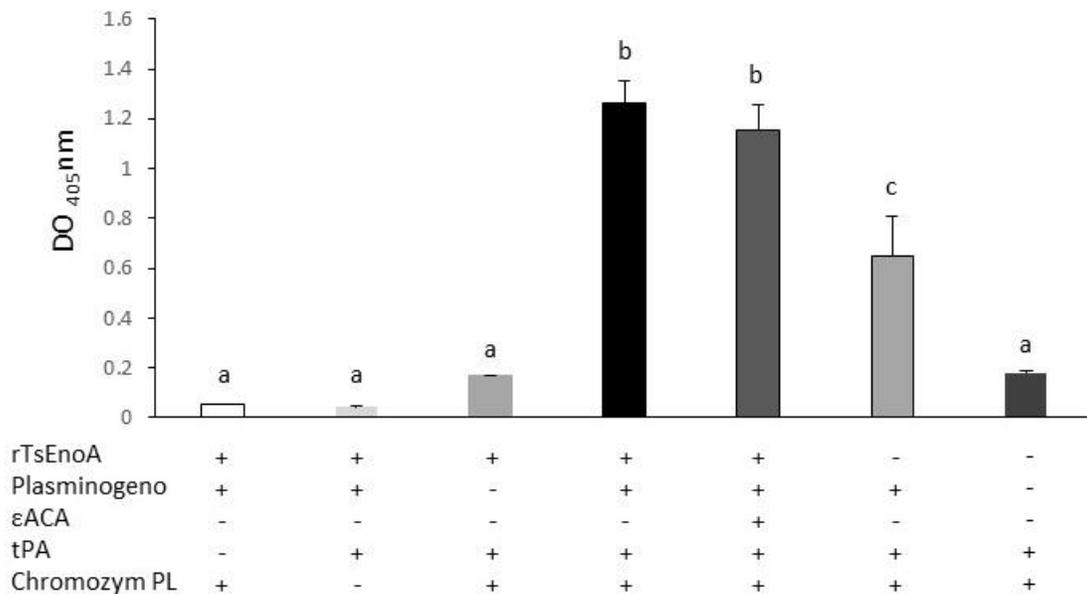
**Figura 13.** Ensayo de unión a plasminógeno con enolasa recombinante de *Taenia solium*. Ctrl: Control negativo, Gelatina en presencia de plasminógeno. Ctrl-E, gelatina en presencia de plasminógeno y EACA. rTsEnoA, es la enolasa recombinante de *T. solium* en presencia de plasminógeno. rTsEnoA-E, en presencia de plasminógeno más EACA. ET, extracto de proteínas totales de *T. solium* en presencia de plasminógeno. ET-E, en presencia de plasminógeno más EACA. Las barras representan la media y la desviación estándar. \*\*\* $P < 0.001$  y \*\* $P < 0.05$  comparado con el control (GraphPad Prism 7).

Considerando los resultados, se procedió a realizar la activación de plasminógeno en presencia de la rTsEnoA, a fin de observar el efecto que muestra la rTsEnoA sobre la activación del plasminógeno. La primera posibilidad es que la enolasa active a su ligando. Para analizar esa posibilidad se incubó plasminógeno en presencia de la rTsEnoA y se comparó el efecto observado durante 24 h con el provocado por el activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA) (Figura 14). Donde se mostró que hay una activación basal del plasminógeno en ausencia de el tPA (línea azul), al igual, que sin Chromozym PL (línea roja) y sin Plg (línea verde), lo cual, no muestra que la rTsEnoA active al plasminógeno por si sola. Sin embargo en presencia del tPA, el plasminógeno muestra una activación maxima a las seis horas (línea morada- Flecha). En presencia de  $\epsilon$ ACA (línea morada tenue) se observa que la inhibición se lleva a cabo durante la maxima activación de Plg. Tambien, en la figura podemos observar que el control sin rTsEnoA (línea amarilla) muestra la activación basal del plasminógeno, el cuál, decae hasta las 15 hrs.



**Figura 14. Cinética de activación de plasminógeno con tPA en presencia de rTsEnoA.** La actividad de la plasmina se determinó midiendo la producción de 4-nitroanilina. El ensayo se realizó en solución en placa en presencia del tPA. La flecha indica la máxima activación del plasminógeno en presencia de rTsEnoA. La flecha indica la máxima activación del plasminógeno.

En la Figura 15, se graficó la activación del plasminógeno a la seis horas con sus respectivos controles, donde, de manera más clara se observó que la rTsEnoA potencia la activación de plasminógeno ya que el control sin rTsEnoA mostró densidades ópticas más bajas con respecto a las obtenidas en presencia de rTsEnoA, siendo estadísticamente significativo. Además, de una ligera inhibición de la activación en presencia de  $\epsilon$ ACA.



**Figura 15.** Ensayo de activación de plasminógeno con tPA en presencia de rTsEnoA a las 6 h. La actividad de la plasmina se determinó midiendo la producción de 4-nitroanilina. El ensayo se realizó en ausencia y presencia de 100 mM de  $\epsilon$ ACA. Las letras (a, b, c) en la parte superior de cada barra indican diferencias significativas  $P < 0.05$  (Kruskal Wallis -Test, ANOVA no paramétrico),  $n = 3$ .

#### 8.4 Evaluación de la expresión de las isoformas de enolasa en cisticerco de *T. solium*

Como se mencionó, se identificaron cuatro isoformas de enolasa en el genoma de *T. solium*. Por lo tanto, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada isoforma y se amplificaron los cDNAs específicos a partir de RNA total de cisticerco de *T. solium*, como control se utilizó el cDNA de la TsEnoA amplificado anteriormente (Figura 16). Los cisticercos expresaron tres de las cuatro isoformas identificadas, la TsEnoA, TsEnoC y TsEno4. Para TsEnoA se observó una banda más intensa (mayor expresión) y para TsEno4 menos intensa (menor expresión). Sin embargo, TsEnoB no se amplificó. Teniendo en cuenta lo anterior, procedimos a clonar y expresar TsEnoC y TsEno4, a fin de poder evaluar sus posibles funciones en el cisticerco.

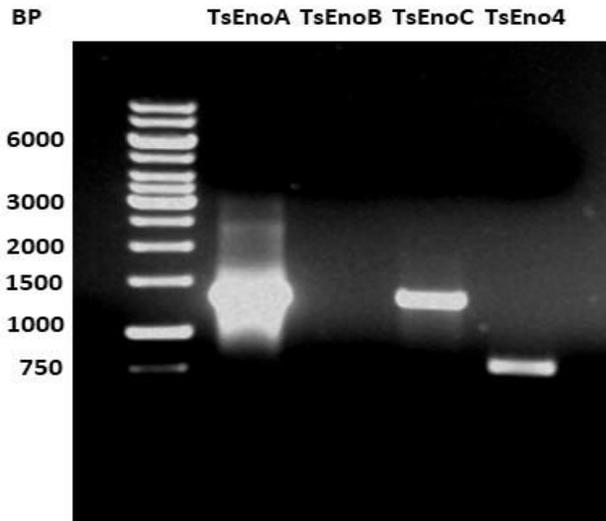


Figura 16. Amplificación de las isoformas de enolasa en cisticerco de *T. solium*. Gel de agarosa al 1% de RT-PCR de las isoformas de enolasa. PB: pares de bases.

### 8.5 Clonación y expresión de TsEnoC y TsEno4

Las isoformas de enolasa de *T. solium* TsEno3 (TsEnoC) y TsEno4, se clonaron en el plásmido pET23a (Figura 17). El tratamiento con las enzimas de restricción BamH1 y Not1 liberó los cDNAs clonados en los tamaños esperados (TsEnoC 1293 pb y TsEno4 753 pb), en cuatro clonas bacterianas distintas (excepto la clona del carril 6). La clonación se confirmó por secuenciación.

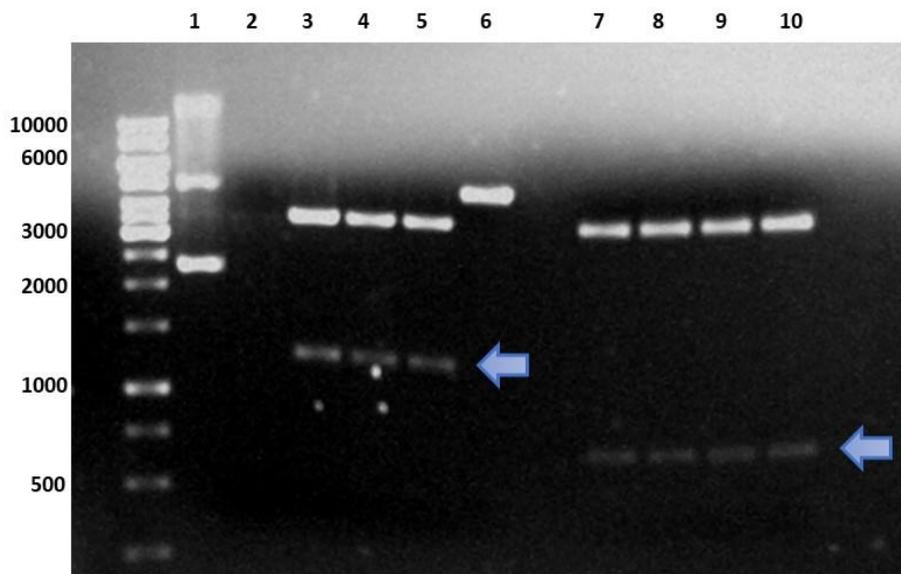
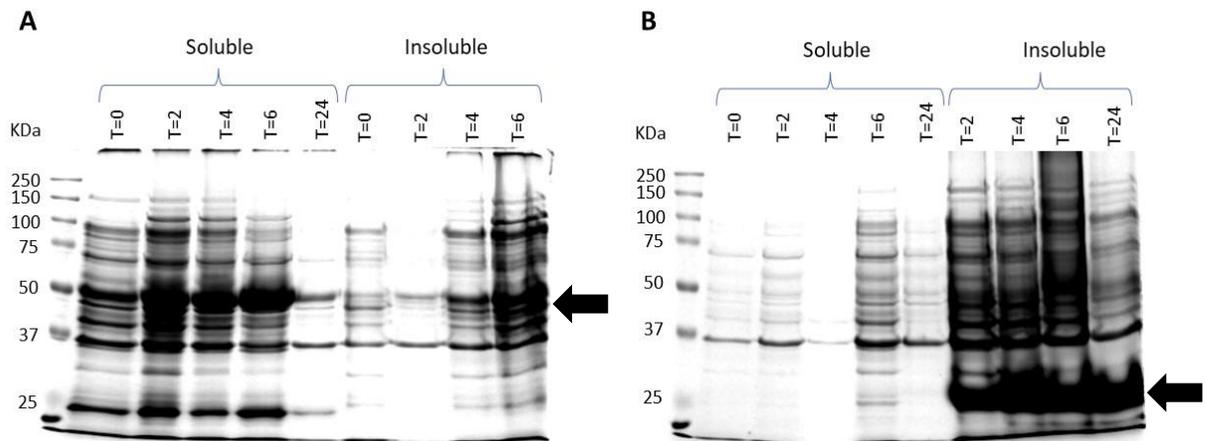


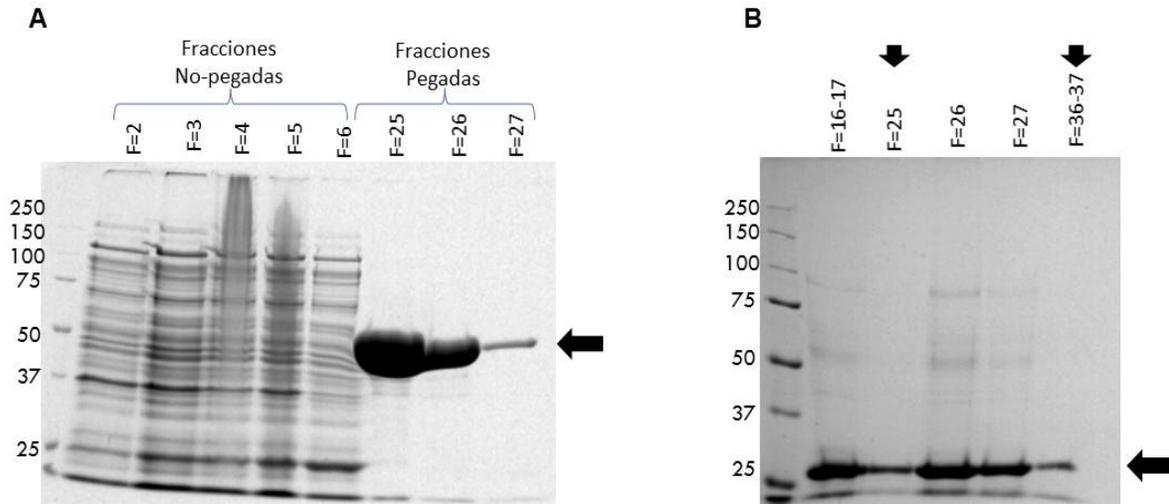
Figura 17. Clonación de TsEno3 y TsEno4. Línea 1- pET23a purificado. Línea 2- pET23a linearizado. Línea 3- 6 clonación y liberación del inserto de TsEno3. Línea 7- 10 clonación y liberación del inserto de TsEno4. El inserto liberado se señala con la flecha azul.

Las proteínas recombinantes se obtuvieron de cultivos de *E. coli* estimuladas con 1 mM de IPTG a diferentes tiempos (Figura 18), obteniéndose una producción máxima a las 6 y 4 horas para rTsEnoC y rTsEno4, respectivamente. La fracción soluble y la fracción insoluble se procesaron para ambas proteínas, observando que la rTsEnoC se encuentra expresada en la fracción soluble (Figura 18A) mientras que la rTsEno4 en la fracción insoluble (Figura 18B).

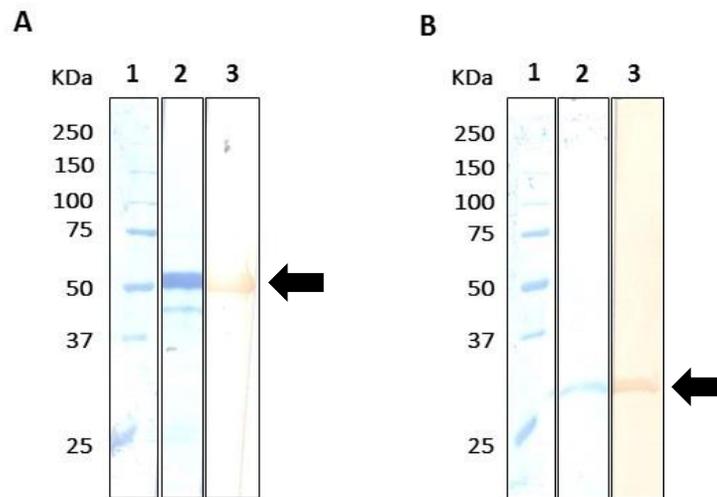


**Figura 18. Expresión de rTsEnoC y rTsEno4.** A) SDS-PAGE de rTsEnoC. B) SDS-PAGE de rTsEno4. La inducción se realizó con 1 mM de IPTG tomando una alícuota a las 0, 2, 4, 6, 24 horas. El extracto soluble y el extracto insoluble se señalan con corchetes. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Las flechas indican las proteínas en el peso esperado.

Por último, se realizó la purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía líquida de afinidad, en columna de níquel (Figura 19). La identidad de las proteínas rTsEnoC y rTsEno4 se confirmó por Western blot con anticuerpos anti-histidina (Figura 20).



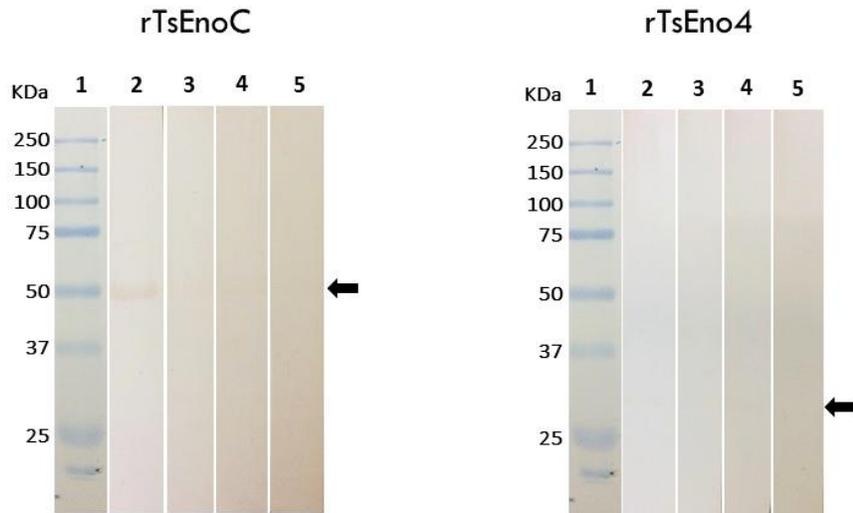
**Figura 19. Purificación de rTsEnoC y rTsEno4.** A) rTsEnoC. Extracto soluble a las 6 horas de inducción con 1 mM de IPTG. B) rTsEno4. Extracto insoluble a las 4 horas de inducción con 1 mM de IPTG. Las flechas largas indican la banda de la proteína esperada y las flechas cortas indican la fracción con la proteínas más pura.



**Figura 20. Western blot de rTsEnoC y rTsEno4 en presencia de anticuerpo anti-Histidina.** A) Western blot de rTsEnoC. B) Western blot de rTsEno4. Línea 1: Marcador de peso molecular y Línea 2: Proteína recombinante teñidos con azul de Coomassie. Línea 3: Western blot anti-Histidina 1:1000. Las flechas indican a la proteína en el peso esperado.

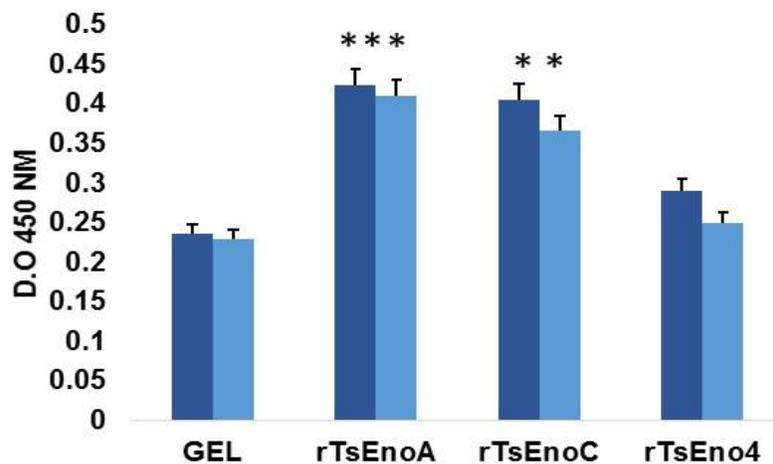
### 8.6 Evaluación de la capacidad de rTsEnoC y rTsEno4 de unir plasminógeno humano

Con el propósito de estudiar si rTsEnoC y rTsEno4 unen plasminógeno, se realizó un *ligand blotting* en ausencia y presencia de  $\epsilon$ ACA. En la Figura 21, se muestra que rTsEnoC une plasminógeno y rTsEno4 no.



**Figura 21.** Ligand blotting de plasminógeno en presencia de rTsEnoC y rTsEno4. El ensayo se realizó en presencia (3) y ausencia (2) de  $\epsilon$ ACA y con sus respectivos controles sin plasminógeno (4) y control del anticuerpo secundario (5). Las flechas negras indican el peso molecular de las proteínas. (1) KDa (peso molecular).

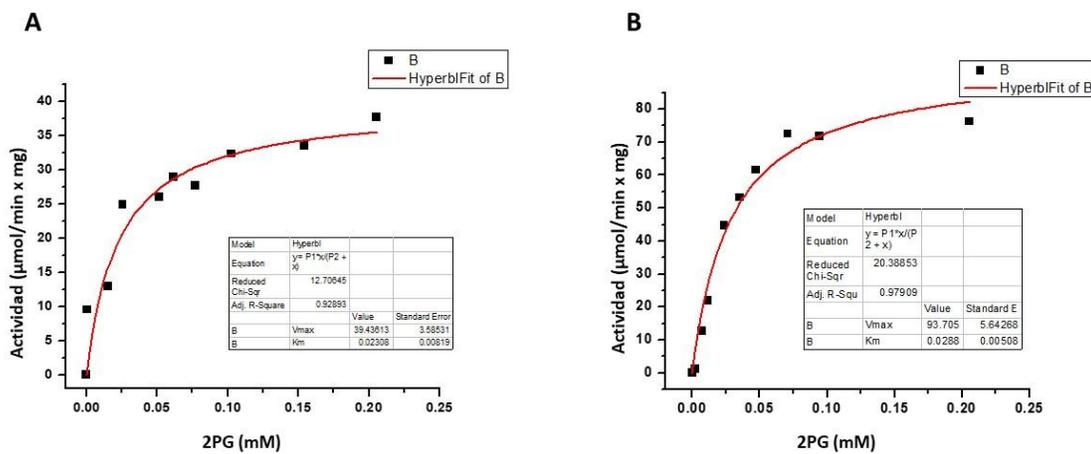
Los resultados anteriores se confirmaron por ELISA. En la Figura 22 se observa que rTsEnoA y rTsEnoC unen plasminógeno en cantidades similares. Por su parte, rTsEno4 no une plasminógeno.



**Figura 22.** ELISA de unión a plasminógeno en presencia de rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4. El ensayo se realizó en presencia (barras azul claro) y ausencia de EACA (barras azul oscuro). Usando gelatina como control negativo (GEL). Las barras representan la desviación estándar. \*\*\* $P < 0.001$  y \*\* $P < 0.08$  comparado con el control.

## 8.7 Actividad enzimática de rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4

Para investigar qué actividad presentan las proteínas recombinantes se midió la oxidación de NADH y la producción de NAD durante la formación del fosfoenolpiruvato acoplado las reacciones de la piruvato cinasa y la lactato deshidrogenasa. La actividad enzimática específica de rTsEnoA es de  $36 \pm 5$  U/mg y su  $K_m$  de  $27 \pm 7$   $\mu$ M (Figura 23A) y la de rTsEnoC fue de  $50 \pm 12$  U/mg y su  $K_m$   $57 \pm 28$   $\mu$ M (Figura 23B). La rTsEnoC mostró alta variabilidad de su  $V_{max}$  y  $K_m$ , lo cual, podría indicar que es más inestable que la rTsEnoA. Por otro lado, rTsEno4 no mostró actividad enzimática en ninguna de las muestras analizadas.

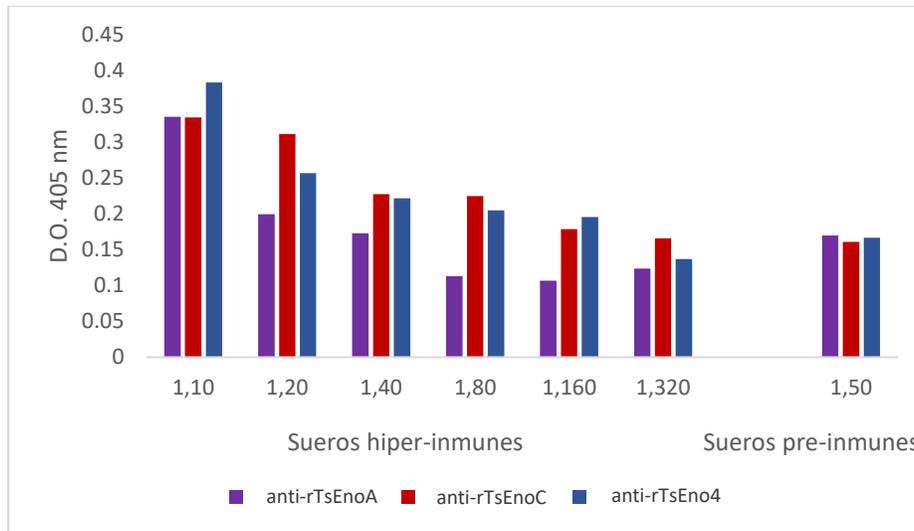


**Figura 23.** Actividad enzimática de rTsEnoA, rTsEnoC. A) rTsEnoA. B) rTsEnoC. La actividad enzimática se midió en cinco experimentos individuales. Para el análisis estadístico se tomaron tres muestras representativas. Las gráficas representan un ejemplo de las muestras evaluadas.

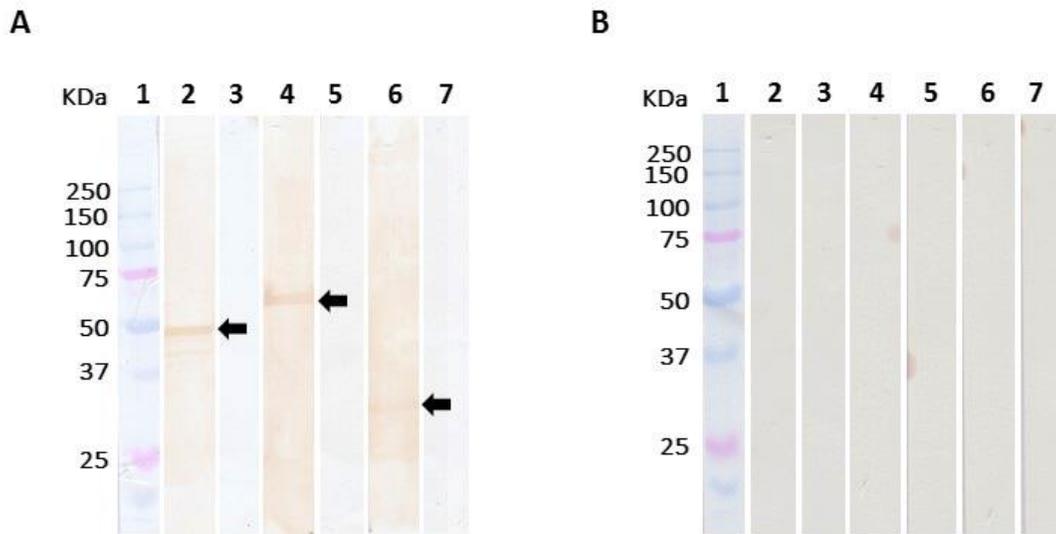
## 8.8 Evaluación de los anticuerpos anti-rTsEnoA, anti-rTsEnoC y anti-rTsEno4

Como se muestra en la Figura 24 se obtuvo un título bajo de anticuerpos anti-rTsEnoA, anti-rTsEnoC y anti-rTsEno4. Se observó que el antisuero para cada proteína recombinante reconoce a la enolasa en una dilución 1:20. Por Western blot observamos el reconocimiento específico del anticuerpo utilizando proteína recombinante de cada isoforma (Figura 25A). Además, para corroborar la especificidad de los sueros realizamos un Western blot cruzando los antisueros, es decir, la rTsEnoA la incubamos con el suero anti-rTsEnoC y anti-rTsEno4 y

así para cada proteína (Figura 25B). Lo que demostró la especificidad de los antisueros para cada proteína, ya que no se observó reacción cruzada.



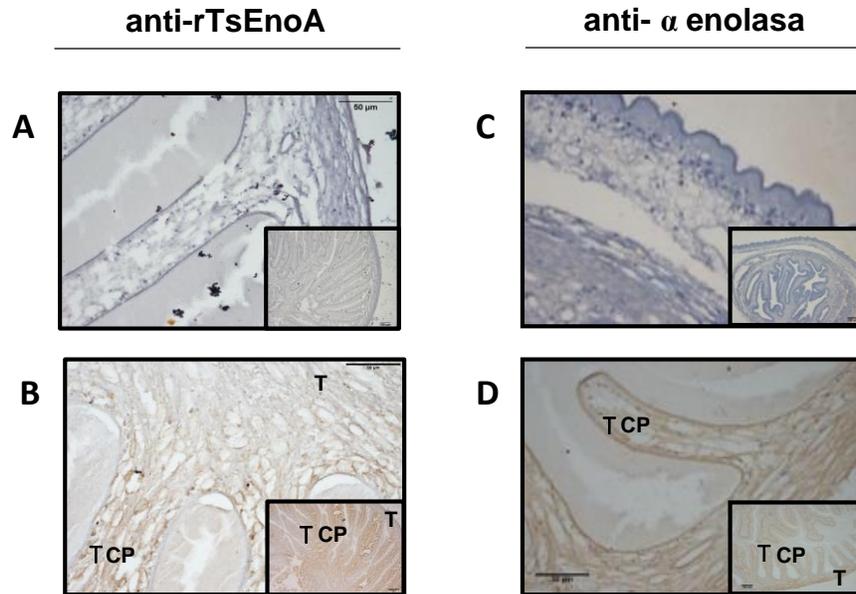
**Figura 24.** Titulación de anticuerpos anti- rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4 hechos en conejo. Los pozos se sensibilizaron con 1  $\mu$ g de rTsEnoA, rTsEnoC o rTsEno4. Posteriormente se incubaron con diferentes diluciones de los anticuerpos anti- rTsEnoA, rTsEnoC o rTsEno4 (sueros hiper-inmunes), respectivamente. Por último, se incubó con anticuerpo anti- IgG de conejo 1:1500 y se reveló con TMB. Como control se utilizó una muestra de suero pre-inmune. El ensayo se realizó por triplicado, en la gráfica se muestra el promedio de los tres experimentos.



**Figura 25.** Western blot con anticuerpos anti- rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4 hechos en conejo. A) Western blot con anticuerpos anti-enolasas. 1- Marcador de peso molecular. 2- Western blot de rTsEnoA en presencia de suero anti-rTsEnoA. 3- Control del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo. 4- Western blot de rTsEnoC en presencia de suero anti-rTsEnoC. 5- Control del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo. 6- Western blot de rTsEno4 en presencia de suero anti-rTsEno4. 7- Control del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo. B) Western blot de las enolasas recombinantes en combinación de sueros. 1- Marcador de peso molecular. 2- Western blot de rTsEnoA en presencia de suero anti-rTsEnoC. 3- Western blot de rTsEnoA en presencia de suero anti-rTsEno4. 4- Western blot de rTsEnoC en presencia de suero anti-rTsEnoA. 5- Western blot de rTsEnoC en presencia de suero anti-rTsEno4. 6- Western blot de rTsEno4 en presencia de suero anti-rTsEnoA. 7- Western blot de rTsEnoA en presencia de suero anti-rTsEnoC.

### 8.9 Inmunolocalización de enolasa en cisticerco de *Taenia solium*

Para conocer la localización de la isoforma EnoA de *T. solium*, utilizamos el anticuerpo producido en conejo en contra de la proteína rTsEnoA. En la Figura 26B se observa el reconocimiento específico del anticuerpo, donde se muestra que la TsEnoA se encuentra ampliamente distribuida en el cisticerco, en tegumento y el tegumento del canal espiral. También, utilizando un anticuerpo comercial anti-alfa enolasa (isoforma de vertebrados), observamos un reconocimiento específico de igual manera que el anticuerpo anti- rTsEnoA (Figura 26D).



**Figura 26.** Inmunolocalización de TsEnoA en cisticerco. **A** y **C**) Control de anticuerpo secundario. **B**) Inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti- rTsEnoA. **D**) Inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti- alfa enolasa ( $\alpha$ -enolasa). Imágenes con barras de 100 $\mu$ m y 50 $\mu$ m. T: tegumento, TCP: tegumento de canal espiral.

## 9. DISCUSIÓN

En infecciones por bacterias, por hongos o por parásitos es importante conocer las vías de migración y establecimiento del patógeno en los tejidos y órganos blanco de su huésped, lo que podría ser fundamental para establecer métodos de diagnóstico, tratamiento y erradicación del patógeno. En el caso particular de la cisticercosis humana y porcina, causada por *Taenia solium*, ésta información es crucial para idear estrategias para su control y tratamientos. Hay que considerar en ésta parasitosis que la localización del parásito en las distintas regiones del sistema nervioso central del huésped determina la patogenia y las intervenciones necesarias para destruirlo.

Poco se conoce acerca de los mecanismos utilizados por *Taenia solium* en sus etapas iniciales de infección para migrar y establecerse en los diferentes tejidos del huésped. Recientemente, se ha reportado en un grupo de patógenos el papel del plasminógeno/plasmina, el cual, se une a la superficie de los patógenos y les permite migrar y establecerse en los tejidos del huésped (Ghosh *et al.*, 2011; González-Miguel *et al.*, 2016). El plasminógeno/plasmina degrada las redes de fibrina y componentes de la matriz extracelular, barreras con las que están en contacto los patógenos, lo que permitiría la migración de los mismos (Bergmann and Hammerschmidt, 2007; Sanderson-Smith *et al.*, 2012; Figuera *et al.*, 2013; Ayón-Núñez *et al.*, 2018a).

En este proyecto de investigación, identificamos por *ligand blotting* en 2D que los cisticercos de *T. solium* expresan varias proteínas con capacidad de unir Plg (Figura 9A). Este fenómeno se ha observado en otros organismos como bacterias y parásitos (Xolalpa *et al.*, 2007; González-Miguel *et al.*, 2012, 2013). Por MS/MS en 2D/SDS-PAGE identificamos siete proteínas que unen Plg: fasciclina 1 y fasciclina 2, MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), malato deshidrogenasa citosólica, anexina, actina y enolasa (Tabla 4).

Las fasciclinas son proteínas poco estudiadas, son glicoproteínas asociadas a membranas, pertenecientes a la superfamilia de moléculas de adhesión celular (CAM), se identificaron por primera vez en un subconjunto de axones fasciculantes en el sistema nervioso central en *Drosophila melanogaster* (Hortsch and Goodman, 1990; Wang *et al.*, 1993; García-Alonso

*et al.*, 1995). En *T. solium*, se identificaron también por 2D/SDS-PAGE un conjunto de puntos entre 65 y 83 kDa nombrados fasciclina-like (TsMFas1), encontrando que se expresaba constitutivamente en estadios de metacestodo y adulto, con localización preferencial en el escólex. La TsMFas1 mostró que puede ser útil para el diagnóstico diferencial de la NC crónica, especialmente donde prevalecen tanto la NC como otras granulomatosis cerebrales infecciosas (Bae *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta el momento no hay ningún reporte que evalúe su papel como proteína de unión a Plg, siendo este trabajo el primero donde se demuestra esta propiedad. Lo mismo sucede con la proteína MAPK, que se conoce que participan en la transducción de señales río abajo de los receptores con actividad de cinasas de tirosina (ZHANG and LIU, 2002; Shilo, 2014).

Hasta la fecha, la malato deshidrogenasa citosólica como proteína de unión a Plg ha sido reportada solamente en *Mycobacterium tuberculosis*, (Xolalpa *et al.*, 2007); sin embargo, no se ha profundizado en su estudio. Nuestro hallazgo en *T. solium* es el primer reporte en parásitos helmintos y sugiere que la malato de estos parásitos une el plasminógeno, lo que contribuiría a la migración y establecimiento en el huésped. Un trabajo previo en cisticercos de *T. solium*, donde caracterizaron a esta enzima, reportó que la enolasa podría estar jugando un rol importante en la relación huésped-parásito, ayudando al parásito a superar el estrés oxidativo desarrollado por la respuesta inmune del huésped, lo que le permitiría sobrevivir durante largos períodos de tiempo, como lo que se observa en individuos asintomáticos (Nava *et al.*, 2011).

Por último, anexina, actina y enolasa son las proteínas que han sido ampliamente estudiadas con la función de unir Plg en diferentes patógenos, incluyendo células cancerígenas. Anexina y actina son proteínas que han sido identificadas en la de membrana de estos organismos, por lo que interactúan con una gran variedad de proteínas, participando activamente en la relación huésped-parásito (Zhang *et al.*, 2007; Roberto Dominguez and Kenneth C. Holmes, 2011). En *T. solium*, la anexina ha sido reportada como una proteína candidata para inmunodiagnóstico (Díaz-Masmela *et al.*, 2013) y la actina como una proteína importante del citoesqueleto (Campos *et al.*, 1990; Ambrosio *et al.*, 2003). Con los hallazgos de este trabajo

de investigación demostramos que además de las propiedades mencionadas también tienen la capacidad de unir Plg.

Como se mencionó anteriormente, la enolasa ha sido la proteína más estudiada en relación a su capacidad de unir plasminógeno y de su activación a plasmina en un número amplio de patógenos. Se ha demostrado que las enolasas de organismos eucariotas son proteínas multifuncionales (Pancholi, 2001). También, existen reportes que varios gusanos planos expresan la enolasa en el tegumento (Jolodar et al., 2003; de la Torre-Escudero et al., 2010; Figueiredo et al., 2015; Zhang et al., 2015). Es importante tener en cuenta, que la enolasa ha sido reportada como una proteína de excreción/secreción (E/S) en varios gusanos planos, incluyendo *T. solium* (Bernal et al., 2004; Hewitson et al., 2009; Victor et al., 2012; Virginio et al., 2012). En cualquier caso, ya sea como productos E/S o como proteína de superficie, la enolasa se ha asociado a la unión y activación de Plg durante la invasión de parásitos a los tejidos del huésped (Ghosh and Jacobs-Lorena, 2011; González-Miguel et al., 2012, 2015a).

La enolasa, al igual que otras proteínas metabólicas (GAPDH, FBP, PGK, FBA, etc.) o estructurales (anexina y actina) ha sido incluida en un grupo de proteínas llamadas *moonlighting* que además de su función principal, dependiendo de su localización, llevan a cabo otras funciones como son: la degradación de MEC y/o modulación de la respuesta inmune (inhibiendo el complemento y/o activando la cascada de coagulación) importantes en la relación huésped-parásito (Karkowska-Kuleta and Kozik, 2014), entre otras. En este estudio se describen nuevas proteínas (fasciclina 1 y 2, la MAPK y la malato deshidrogenasa citosólica) con otra función, la de unir plasminógeno que podrían formar parte de este grupo de proteínas importantes en la relación huésped-parásito. Hasta el momento los reportes relacionados a estas proteínas *moonlighting*, indican que contribuyen con la virulencia de bacterias, hongos, protozoos y helmintos (Karkowska-Kuleta and Kozik, 2014; Wang et al., 2014).

En este estudio, confirmamos que la enolasa de *T. solium* muestra una amplia distribución en los tejidos del cisticerco (Figura 2 suplementaria) (Ayón-Núñez et al., 2018b). Se observó en el tegumento y en los citones subtegumentales donde se encuentran productos E/S.

También se identificó en el escolex invaginado; la enolasa se expresa claramente en el tegumento del canal espiral y otros compartimentos celulares. Esta distribución tisular extendida es compatible tanto con una enzima con un papel metabólico como con una proteína involucrada en la interacción huésped-parásito.

En estudios recientes en *T. multiceps* y *T. pisiformis*, también se ha reportado que la enolasa tiene la capacidad de unir plasminógeno (Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Por lo que se ha propuesto que podría estar desempeñando un papel importante en la relación huésped-parásito a través de su capacidad de activación de Plg.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, profundizamos en la caracterización de la enolasa de *T. solium*. Como se mencionó anteriormente, se identificaron cuatro isoformas, mismas que no habían sido reportadas y caracterizadas en este grupo de parásitos. En vertebrados se han sido descrito cuatro genes de enolasa: Eno1, Eno2, Eno3 y Eno4 (Pearce *et al.*, 1976; Schmechel *et al.*, 1978; Ueta *et al.*, 2004). Sin embargo, pocos estudios se han realizado acerca de la filogenia de esta proteína (Tracy and Hedges, 2000; Harper and Keeling, 2004; Piast *et al.*, 2005). Además, para la realización de estos estudios se incluyeron pocos ejemplos de enolasas de invertebrados. Hasta donde sabemos, no existe evidencia disponible sobre la relación entre las isoformas de enolasa de vertebrados e invertebrados.

Realizando una búsqueda en el genoma de *T. solium* y de organismos invertebrados relacionados, identificamos también cuatro genes de enolasa: Eno1, Eno2, Eno3 y Eno4. El análisis filogenético se realizó con 75 secuencias de aminoácidos de enolasa de organismos pertenecientes a seis reinos, incluyendo las cuatro secuencias de *T. solium*. Analizando la topología del árbol concluimos que el origen de las isoformas de enolasa en vertebrados, a excepción de Eno4, es independiente de las isoformas de enolasa en invertebrados (Figura 11). Por lo que proponemos una nueva designación (EnoA, EnoB, EnoC y Eno4) para enfatizar que las isoformas de enolasa de invertebrados no son ortólogos de sus contrapartes de vertebrados.

Tres de las isoformas de enolasa de *T. solium* (TsEnoA, TsEnoB y TsEnoC) tienen entre 433-450 residuos de aminoácidos, mientras que TsEno4 es aproximadamente un 40% más

pequeña (250). En vertebrados las enolasas reportadas no muestran diferencia significativa en la composición de aminoácidos (Pearce *et al.*, 1976; Schmechel and Marangos, 1978; Ueta *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2013). Además de las lisinas identificadas para la unión de plasminógeno, en la enolasa ha sido identificado un motivo interno (<sub>248</sub>FYDKERK<sub>256</sub>), que ha sido reportado que interviene en la unión (Bergmann *et al.*, 2003; Bernal *et al.*, 2004; Ehinger *et al.*, 2004; Vanegas *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2011). Este motivo (<sub>251</sub>FYQDGKYN<sub>259</sub>) fue identificado en tres de las isoformas reportadas en este trabajo TsEnoA, TsEnoB y TsEnoC, pero no se identificó en TsEno4 (Figura 10). Estudios posteriores se tendrían que realizar para confirmar que el motivo identificado está participando en la unión a plasminógeno.

Con respecto al nivel de expresión de las isoformas, los ensayos de RT-PCR, mostraron que TsEnoA, TsEnoC y TsEno4 se expresan claramente, mientras que no se detectó TsEnoB, posiblemente porque se podría estar expresando en otra etapa del ciclo de vida del parásito, como la oncosfera o el gusano adulto (Figura 16).

En vertebrados, las isoformas de enolasa son tejido específicas: ENO1- enolasa no neuronal, ENO2- enolasa neuronal específica, ENO3- enolasa específica del músculo y ENO4- enolasa específica de espermatozoides (Pearce *et al.*, 1976; Schmechel and Marangos, 1978; Ueta *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2013). Sería interesante estudiar la expresión de las enolasas de *T. solium* en cortes de los diferentes estadios de vida del parásito para conocer su localización.

Como se observa en la Figura 16, TsEnoA resultó ser la enolasa con mayor expresión, lo que se puede relacionar con los resultados de secuenciación de cDNA en el genoma de *T. solium* (Tsai *et al.*, 2013), donde de 75 000 ETS de cisticercos y gusano adulto; 674 se identificaron para TsEnoA, mientras que solo se encontró un transcrito para Eno4 (datos no mostrados). Por otro lado, la alta expresión de TsEnoA podría deberse también a su participación en la glicólisis, un proceso metabólico clave para *T. solium*, ya que es bien conocido que este parásito es un alto consumidor de glucosa (Willms *et al.*, 2005).

Como observamos en la Figura 22, las enolasas recombinantes rTsEnoA y rTsEnoC, tienen la capacidad de unir Plg, lo que concuerda con los resultados obtenidos de los *ligand blotting*

realizados con el extracto crudo de cisticercos. Sin embargo, rTsEno4 no mostró esta propiedad, lo que era de esperarse si nos basamos en el análisis de la secuencia de aminoácidos, donde claramente se observa que esta enolasa carece del motivo interno de unión a Plg. Hasta el momento, en otros organismos relacionados solamente se ha determinado la unión de Plg en una enolasa (posiblemente refiriéndose a la Eno1), (Figuera *et al.*, 2013; Ayón-Núñez *et al.*, 2018a).

Por otro lado, en este trabajo demostramos que rTsEnoA aumenta más de dos veces la activación de Plg en presencia de tPA, lo que sugiere que la enolasa potencia la acción de este activador fisiológico del plasminógeno (Gráfica 3). Sin embargo, cuando se añadió a la mezcla de reacción el inhibidor competitivo  $\epsilon$ ACA, se observó una ligera disminución en la activación, lo que sugiere que la unión de Plg y la activación por rTsEnoA no involucra los residuos de lisina y sí al motivo interno de la proteína. Claramente,  $\epsilon$ ACA no es un inhibidor adecuado para rTsEnoA, resultados similares se obtuvieron por otro grupo de trabajo con la enolasa de *T. solium* (Zhang *et al.*, 2018).

Con el fin de continuar indagando en la caracterización de las enolasas de *T. solium*, se evaluó la actividad enzimática de cada isoforma. Los resultados muestran una actividad de  $36 \pm 5$  U/mg, Km de  $27 \pm 7$   $\mu$ M para rTsEnoA; y de  $50 \pm 12$  U/mg y Km  $57 \pm 28$   $\mu$ M para rTsEnoC. De acuerdo con los resultados de las Kms se determinó que la rTsEnoC es más inestable que la rTsEnoA, debido a que muestra variaciones en la medición de la Vmax y Km (con desviaciones estándar altas). Este resultado nos podría estar indicando que la TsEnoA podría tener un papel primordial en la glicolisis y ante la deficiencia o silenciamiento de esta enzima, podría estar actuando la TsEnoC. Las actividades enzimáticas obtenidas fueron similares a las de otras especies de helmintos como por ejemplo: *Clonorchis sinensis* ( $36.5 \pm 0.3$  U/mg), *S. japonicum* ( $35.8 \pm 2.0$  U/mg), *T. multiceps* (46.91 U/mg) y *T. pisiformis* ( $30.71 \pm 2.2$  U/mg) (Yang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

Por otro lado, la rTsEno4 no mostró actividad enzimática, por lo que podríamos decir que es una *enolasa-like* ya que se agrupa en la familia de estas proteínas, como se observó en el estudio filogenético, pero no lleva a cabo la función principal. Analizando la secuencia de

aminoácidos de la TsEno4 podemos observar que no muestra el sitio catalítico de la enzima, motivo por el cual no es una enzima que este participando en la glicolisis. En organismos relacionados con *T. solium* como *C. sinensis*, *Schistosoma haematobium*, *Echinops telfairi* se ha reportado la Eno4 como *Eno4-like*, o bien, no se ha identificado como por ejemplo, en *T. asiática*, *Echinostoma caproni*, *Schistosoma margrebowiei*, etc. Aunque considerando que solo se determinó por el análisis de la secuencia de aminoácidos y no se ha profundizado en su estudio (datos obtenidos de la base de datos de NCBI) este resultado no es concluyente. En contraste, en humanos la Eno4 es específica de espermatozoides, tiene los motivos que caracterizan a la proteína y es funcional, participando en la glicolisis (Nakamura *et al.*, 2013). Posiblemente, TsEno4 esté realizando otro tipo de función en *T. solium*, función en la que se tendría que indagar en un futuro.

Por último, como parte de en este trabajo, se produjeron anticuerpos policlonales específicos para las proteínas recombinantes de cada isoforma (rTsEnoA, rTsEnoC y rTsEno4). Por Western blot se demostró la especificidad de los anticuerpos para cada isoforma (Figura 25). Sin embargo, utilizando un extracto total de tejido de cerebro y músculo esquelético de cerdo, se observó reacción cruzada entre el anticuerpo anti-rTsEnoA y anti-rTsEnoC (datos no mostrados), lo cual, era de esperarse por que las proteínas tiene un alto grado de identidad. Sin embargo, no hubo reconocimiento cuando se utilizó el anticuerpo anti-rTsEno4 seguramente debido a que esta proteína tiene un bajo porcentaje de identidad con las enolasas de mamíferos. Utilizando el anticuerpo específico para rTsEnoA comprobamos que la proteína se expresa ampliamente en el cisticerco, en el tegumento y el tegumento del canal espiral (Figura 26B). Asimismo, cuando utilizamos un anticuerpo comercial anti  $\alpha$ -enolasa de vertebrados pudimos observar un reconocimiento similar (Figura 26D), lo que nos indica que hay reconocimiento del anticuerpo en las mismas zonas del cisticerco, aunque filogenéticamente no se agrupan. Sin embargo, para determinar diferencias en la localización de las isoformas falta concluir con las inmunohistoquímicas con los anticuerpos anti- rTsEnoC y anti-rTsEno4.

En resumen, en este trabajo, se reportan por primera vez las proteínas de *T. solium* con capacidad de unir plasminógeno, dentro de las cuales, se identificaron las diferentes

isoformas de enolasa, en las que se ha profundizado su estudio. Es bien conocido que en otros organismos la enolasa participa en múltiples funciones dependiendo de su localización, cuando se expresa en la superficie se ha reportado que participa degradando los coágulos de fibrina y componentes de la matriz extracelular (MEC) facilitando la migración e invasión de los organismos a los diferentes tejidos del huésped (Bergmann and Hammerschmidt, 2007; Figuera *et al.*, 2013; Ayón-Núñez *et al.*, 2018a).

La información sobre el mecanismo por el cual los parásitos promueven la degradación de la MEC es limitada (McKerrow *et al.*, 1983; Lenzi *et al.*, 1991; Lu and Lai, 2013; Thibeaux *et al.*, 2014). Se ha sugerido que la interacción de plasminógeno-plasmina con proteínas de microorganismos, incluidas las bacterias, desempeñan un papel clave en la degradación de la MEC, actuando sobre varias proteínas como, la fibronectina, laminina y trombospondina, entre otras (Bergmann *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2012; Grossi *et al.*, 2016). También en parásitos, se ha propuesto que la degradación de los coágulos de fibrina y la MEC puede facilitar la migración a los tejidos del huésped durante las primeras etapas de la infección, así como su establecimiento en su localización final (González-Miguel *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015).

Tomando en cuenta lo anterior, podemos especular que la degradación de la MEC podría permitir que el cisticerco crezca y sobreviva en el tejido del huésped. La interacción enolasa-plasminógeno podría ser uno de los mecanismos que estaría utilizando *T. solium*, entre otros, como la utilización de las proteasas (White *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). En este estudio, se demostró la unión y activación de Plg en presencia de enolasa de cisticerco de *T. solium*. Tomando en cuenta el reporte de (Santivañez *et al.*, 2010), donde identificaron a la enolasa en el proteoma de oncosferas activadas, podríamos especular que en conjunto con otras proteínas también identificadas en nuestro trabajo con capacidad de unir plasminógeno, como la actina y la anexina, facilitarían la migración de las oncosferas a los diferentes tejidos del huésped. La oncosfera tiene que pasar varias barreras físicas para llegar a su destino final, degradar componentes de la MEC y del torrente sanguíneo como son las redes de fibrina (coágulos). Por lo que sería interesante evaluar la unión enolasa-plasminógeno en las oncosferas activadas de *T. solium*, lo que permitiría demostrar que este

mecanismo es un factor importante en la migración y establecimiento del parásito a los tejidos del huésped en etapas tempranas. También sería interesante estudiar si las isoformas de *T. solium* identificadas, podrían estar jugando un papel más protagónico en este proceso. Este trabajo abre la pauta para el estudio de los receptores de plasminógeno en la relación huésped-parásito en infecciones causadas por *T. solium*.

## 10. CONCLUSIONES

*Taenia solium* expresa proteínas que tienen la capacidad de unir plasminógeno. En este estudio identificamos siete: fascicilina-1, fascicilina-2, enolasa, MAPK, anexina, actina y malato deshidrogenasa citosólica. De las cuales, abordamos el estudio de la enolasa.

Se identificaron cuatro isoformas de enolasa (EnoA, EnoB, EnoC y Eno4) en *Taenia solium*.

La enolasa (rTsEnoA) potencia la activación del plasminógeno (a plasmina), sugiriendo su posible participación en la degradación de coágulos de fibrina y componentes de la matriz extracelular, barreras físicas con las que está en contacto el huevo-cisticerco de *T. solium*, durante el proceso de invasión en el huésped.

## 11. PERSPECTIVAS

- Realizar inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos anti-rTsEnoC y anti-rTsEno4 para observar su localización en el cisticerco de *T. solium*.
- Evaluar el papel de la enolasa(s) de *T. solium* en la migración y degradación a través de ensayos indirectos.
- Continuar con la caracterización de las isoformas de enolasa de *T. solium*.
- Estudiar que función tiene Eno4 en *T. solium*.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, H., Rondón-Mercado, R., Avilán, L. and Concepción, J. L. (2016). Interaction of *Trypanosoma evansi* with the plasminogen-plasmin system. *Veterinary Parasitology*. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.07.016.
- Almeida, L., Vanegas, G., Calcagno, M., Concepción, J. L. and Avilan, L. (2004). Plasminogen interaction with *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. doi: 10.1590/S0074-02762004000100011.
- Ambrosio, J. R., Reynoso-Ducoing, O., Hernández-Sánchez, H., Correa-Piña, D., González-Malerva, L., Cruz-Rivera, M. and Flisser, A. (2003). Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): Tisular distribution and detection of isoforms. *Cell Biology International*. doi: 10.1016/S1065-6995(03)00142-2.
- Ayón-Núñez, D. A., Fragoso, G., Bobes, R. J. and Laclette, J. P. (2018a). Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases. *Bioscience Reports*. doi: 10.1042/BSR20180705.
- Ayón-Núñez, D. A., Fragoso, G., Espitia, C., García-Varela, M., Soberón, X., Rosas, G., Laclette, J. P. and Bobes, R. J. (2018b). Identification and characterization of *Taenia solium* enolase as a plasminogen-binding protein. *Acta Tropica*. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.02.020.
- Bae, Y. A., Yeom, J. S., Wang, H., Kim, S. H., Ahn, C. S., Kim, J. T., Yang, H. J. and Kong, Y. (2014). *Taenia solium* metacestode fasciclin-like protein is reactive with sera of chronic neurocysticercosis. *Tropical Medicine and International Health*. doi: 10.1111/tmi.12302.
- Barthel, D., Schindler, S. and Zipfel, P. F. (2012). Plasminogen is a complement inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M111.323287.
- Bergmann, S. and Hammerschmidt, S. (2007). Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thrombosis and Haemostasis*. doi: 10.1160/TH07-02-0117.
- Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G. S. and Hammerschmidt, S. (2003). Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed  $\alpha$ -enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03557.x.
- Bergmann, S., Rohde, M., Preissner, K. T. and Hammerschmidt, S. (2005). The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thrombosis and Haemostasis*. doi: 10.1160/TH05-05-0369.
- Bernal, D., De La Rubia, J. E., Carrasco-Abad, A. M., Toledo, R., Mas-Coma, S. and Marcilla, A. (2004). Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Letters*. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00306-0.

- Bhattacharya, S., Ploplis, V. A. and Castellino, F. J.** (2012). Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi: 10.1155/2012/482096.
- Bobes, R. J., Fragoso, G., Fleury, A., García-Varela, M., Sciutto, E., Larralde, C. and Laclette, J. P.** (2014). Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. *Infection, Genetics and Evolution*. doi: 10.1016/j.meegid.2014.02.005.
- Brewer, J. M., Glover, C. V. C., Holland, M. J. and Lebioda, L.** (2003). Enzymatic function of loop movement in enolase: Preparation and some properties of H159N, H159A, H159F, and N207A enolases. *Journal of Protein Chemistry*. doi: 10.1023/A:1025390123761.
- Calcagno, M., Avilan, L., Colasante, C., Berrueta, L. and Salmen, S.** (2002). Interaction of different *Leishmania mexicana* morphotypes with plasminogen. *Parasitology Research*. doi: 10.1007/s00436-002-0688-2.
- Campos, A., Bernard, P., Fauconnier, A., Landa, A., Gómez, E., Hernández, R., Willms, K. and Laclette, J. P.** (1990). Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*. doi: 10.1016/0166-6851(90)90082-W.
- Castellino, F. J. and Powell, J. R.** (1981). *Human Plasminogen*. doi: 10.1016/S0076-6879(81)80031-6.
- Cesarman-Maus, G. and Hajjar, K. A.** (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.
- Chai, G., Brewer, J. M., Lovelace, L. L., Aoki, T., Minor, W. and Lebioda, L.** (2004). Expression, purification and the 1.8 angstroms resolution crystal structure of human neuron specific enolase. *Journal of molecular biology*. doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.068.
- COLLEN, D., VAN HOEF, B., SCHLOTT, B., HARTMANN, M., GÜHRS, K. -H and LIJNEN, H. R.** (1993). Mechanisms of activation of mammalian plasma fibrinolytic systems with streptokinase and with recombinant staphylokinase. *European Journal of Biochemistry*. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18147.x.
- Cork, A. J., Ericsson, D. J., Law, R. H. P., Casey, L. W., Valkov, E., Bertozzi, C., Stamp, A., Jovcevski, B., Aquilina, J. A., Whisstock, J. C., Walker, M. J. and Kobe, B.** (2015). Stability of the octameric structure affects plasminogen-binding capacity of streptococcal enolase. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0121764.
- de la Torre-Escudero, E., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R., Siles-Lucas, M. and Oleaga, A.** (2010). Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Veterinary Parasitology*. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.06.011.
- Del Brutto, O. H.** (2012). Neurocysticercosis. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*. doi:

10.1212/01.CON.0000423853.47770.90.

Dentovskaya, S. V., Platonov, M. E., Svetoch, T. E., Kopylov, P. K., Kombarova, T. I., Ivanov, S. A., Shaikhutdinova, R. Z., Kolombet, L. V., Chauhan, S., Ablamunits, V. G., Motin, V. L., Uversky, V. N. and Anisimov, A. P. (2016). Two isoforms of *Yersinia pestis* plasminogen activator Pla: Intraspecies distribution, intrinsic disorder propensity, and contribution to virulence. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0168089.

Diaz-Masmela, Y., Fragoso, G., Ambrosio, J. R., Mendoza-Hernández, G., Rosas, G., Estrada, K., Carrero, J. C., Sciutto, E., Laclette, J. P. and Bobes, R. J. (2013). Immunodiagnosis of porcine cysticercosis: Identification of candidate antigens through immunoproteomics. *Veterinary Journal*. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.09.056.

Edwards, Y. H. and Grootegoed, J. A. (1983). A sperm-specific enolase. *J.Reprod.Fertil*. doi: 10.1530/jrf.0.0680305.

Ehinger, S., Schubert, W. D., Bergmann, S., Hammerschmidt, S. and Heinz, D. W. (2004). Plasmin(ogen)-binding  $\alpha$ -Enolase from streptococcus pneumoniae: Crystal structure and evaluation of plasmin(ogen)-binding sites. *Journal of Molecular Biology*. doi: 10.1016/j.jmb.2004.08.088.

Erttmann, K. D., Kleensang, A., Schneider, E., Hammerschmidt, S., Büttner, D. W. and Gallin, M. (2005). Cloning, characterization and DNA immunization of an *Onchocerca volvulus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Ov-GAPDH). *Biochimica et biophysica acta*. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.12.010.

Esquivel-Velázquez, M., Ostoa-Saloma, P., Morales-Montor, J., Hernández-Bello, R. and Larralde, C. (2011). Immunodiagnosis of neurocysticercosis: Ways to focus on the challenge. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi: 10.1155/2011/516042.

Figueiredo, B. C., Da'dara, A. A., Oliveira, S. C. and Skelly, P. J. (2015). Schistosomes Enhance Plasminogen Activation: The Role of Tegumental Enolase. *PLoS Pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1005335.

Figuera, L., Gómez-Arreaza, A. and Avilán, L. (2013). Parasitism in optima forma: Exploiting the host fibrinolytic system for invasion. *Acta Tropica*. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.06.023.

Fletcher, L., Rider, C. C. and Taylor, C. B. (1976). Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *BBA - Enzymology*. doi: 10.1016/0005-2744(76)90077-2.

Fleury, A., Carrillo-Mezo, R., Flisser, A., Sciutto, E. and Corona, T. (2011). Subarachnoid basal neurocysticercosis: A focus on the most severe form of the disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. doi: 10.1586/eri.10.150.

Fleury, A., Sciutto, E. and Larralde, C. (2012). Neurocysticercosis is still prevalent in Mexico. *Salud Publica de Mexico*. doi: 10.1590/S0036-36342012000600012.

- Flisser, A. (2013). State of the art of *Taenia solium* as compared to *Taenia asiatica*. *Korean Journal of Parasitology*. doi: 10.3347/kjp.2013.51.1.43.
- Forsgren, M., Råden, B., Israelsson, M., Larsson, K. and Hedén, L. O. (1987). Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *FEBS letters*. doi: 10.1016/0014-5793(87)81501-6.
- García-Alonso, L., VanBerkum, M. F., Grenningloh, G., Schuster, C. and Goodman, C. S. (1995). Fasciclin II controls proneural gene expression in *Drosophila*. *Proceedings of the national academy of sciences*. doi: 10.1073/pnas.92.23.10501.
- Garcia, H. H., Gonzalez, A. E. and Gilman, R. H. (2003). Diagnosis, treatment and control of *Taenia solium* cysticercosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. doi: 10.1097/00001432-200310000-00007.
- Ghosh, A. K., Coppens, I., Gardsvoll, H., Ploug, M. and Jacobs-Lorena, M. (2011). Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.1103657108.
- Gómez-Arreaza, A., Acosta, H., Barros-Álvarez, X., Concepción, J. L., Albericio, F. and Avilan, L. (2011). *Leishmania mexicana*: LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated C-kinase) is a plasminogen binding protein. *Experimental Parasitology*. doi: 10.1016/j.exppara.2011.01.008.
- Gonzales, I., Rivera, J. T. and Garcia, H. H. (2016). Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. *Parasite Immunology*. doi: 10.1111/pim.12307.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J. A. and Simón, F. (2012). Excretory/secretory antigens from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. *Molecular and Biochemical Parasitology*. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.10.010.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J. A. and Simón, F. (2013). Surface associated antigens of *Dirofilaria immitis* adult worms activate the host fibrinolytic system. *Veterinary Parasitology*. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.01.028.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J. A. and Simón, F. (2015). Can the activation of plasminogen/plasmin system of the host by metabolic products of *Dirofilaria immitis* participate in heartworm disease endarteritis? *Parasites and Vectors*. doi: 10.1186/s13071-015-0799-0.
- González-Miguel, J., Siles-Lucas, M., Kartashev, V., Morchón, R. and Simón, F. (2016). Plasmin in Parasitic Chronic Infections: Friend or Foe? *Trends in Parasitology*. doi: 10.1016/j.pt.2015.12.012.
- Grossi, G., Grimaldi, A., Cardone, R. A., Monné, M., Reshkin, S. J., Girardello, R., Greco, M. R., Coviello, E., Laurino, S. and Falabella, P. (2016). Extracellular matrix degradation via enolase/plasminogen interaction: Evidence for a mechanism conserved in Metazoa. *Biology of the Cell*. doi: 10.1111/boc.201500095.

- Harper, J. T. and Keeling, P. J.** (2004). Lateral gene transfer and the complex distribution of insertions in eukaryotic enolase. *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2004.06.048.
- He, L., Ren, M., Chen, X., Wang, X., Li, S., Lin, J., Liang, C., Liang, P., Hu, Y., Lei, H., Bian, M., Huang, Y., Wu, Z., Li, X. and Yu, X.** (2014). Biochemical and immunological characterization of annexin B30 from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products. *Parasitology Research*. doi: 10.1007/s00436-014-3935-4.
- Horrevoets, A. J. G., Smilde, A. E., Fredenburgh, J. C., Pannekoek, H. and Nesheim, M. E.** (1995). The activation-resistant conformation of recombinant human plasminogen is stabilized by basic residues in the amino-terminal hinge region. *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.270.26.15770.
- Hortsch, M. and Goodman, C. S.** (1990). *Drosophila* fasciclin I, a neural cell adhesion molecule, has a phosphatidylinositol lipid membrane anchor that is developmentally regulated. *Journal of Biological Chemistry*.
- Hsiao, K. C., Shih, N. Y., Fang, H. L., Huang, T. S., Kuo, C. C., Chu, P. Y., Hung, Y. M., Chou, S. W., Yang, Y. Y., Chang, G. C. and Liu, K. J.** (2013). Surface  $\alpha$ -Enolase Promotes Extracellular Matrix Degradation and Tumor Metastasis and Represents a New Therapeutic Target. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0069354.
- Hu, Y., Zhang, E., Huang, L., Li, W., Liang, P., Wang, X., Xu, J., Huang, Y. and Yu, X.** (2014). Expression profiles of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Clonorchis sinensis*: a glycolytic enzyme with plasminogen binding capacity. *Parasitology Research*. doi: 10.1007/s00436-014-4144-x.
- Jeffery, C. J.** (2018). Protein moonlighting: What is it, and why is it important? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. doi: 10.1098/rstb.2016.0523.
- Johari, V. and Loke, C.** (2012). Brief Overview of the Coagulation Cascade. *Disease-a-Month*. doi: 10.1016/j.disamonth.2012.04.004.
- Jolodar, A., Fischer, P., Bergmann, S., Büttner, D. W., Hammerschmidt, S. and Brattig, N. W.** (2003). Molecular cloning of an  $\alpha$ -enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*. doi: 10.1016/S0167-4781(03)00083-6.
- Karkowska-Kuleta, J. and Kozik, A.** (2014). Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. *Molecular Oral Microbiology*. doi: 10.1111/omi.12078.
- Kornblatt, M. J., Kornblatt, J. A. and Hancock, M. A.** (2011). The interaction of canine plasminogen with streptococcus pyogenes enolase: They bind to one another but what is the nature of the structures involved? *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0028481.
- Kost, C., Benner, K., Stockmann, A., Linder, D. and Preissner, K. T.** (1996). Limited plasmin proteolysis of vitronectin: Characterization of the adhesion protein as morpho-

- regulatory and angiostatin-binding factor. *European Journal of Biochemistry*. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0682d.x.
- Lähteenmäki, K., Kuusela, P. and Korhonen, T. K. (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiology Reviews*. doi: 10.1016/S0168-6445(01)00067-5.
- Lama, A., Kucknoor, A., Mundodi, V. and Alderete, J. F. (2009). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*. doi: 10.1128/IAI.00157-09.
- Law, R. H. P., Caradoc-Davies, T., Cowieson, N., Horvath, A. J., Quek, A. J., Encarnacao, J. A., Steer, D., Cowan, A., Zhang, Q., Lu, B. G. C., Pike, R. N., Smith, A. I., Coughlin, P. B. and Whisstock, J. C. (2012). The X-ray Crystal Structure of Full-Length Human Plasminogen. *Cell Reports*. doi: 10.1016/j.celrep.2012.02.012.
- Law, R. H. P., Abu-Ssaydeh, D. and Whisstock, J. C. (2013). New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Current Opinion in Structural Biology*. doi: 10.1016/j.sbi.2013.10.006.
- Lenzi, H. L., Lenzi, J. A., Kerr, I. B., Antunes, S. L., Mota, E. M. and Oliveira, D. N. (1991). Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. doi: 10.1590/S0074-02761991000700012.
- Li, W. H., Qu, Z. G., Zhang, N. Z., Yue, L., Jia, W. Z., Luo, J. X., Yin, H. and Fu, B. Q. (2015). Molecular characterization of enolase gene from *Taenia multiceps*. *Research in Veterinary Science*. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.06.013.
- Lu, C. Y. and Lai, S. C. (2013). Matrix metalloproteinase-2 and -9 lead to fibronectin degradation in astroglia infected with *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica*. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.11.002.
- Lu, Q., Lu, H., Qi, J., Lu, G. and Gao, G. F. (2012). An octamer of enolase from *Streptococcus suis*. *Protein and Cell*. doi: 10.1007/s13238-012-2040-7.
- Marcilla, A., Pérez-García, A., Espert, A., Bernal, D., Muñoz-Antolí, C., Esteban, J. G. and Toledo, R. (2007). *Echinostoma caproni*: Identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. *Experimental Parasitology*. doi: 10.1016/j.exppara.2007.03.011.
- Marti, D. N., Hu, C. K., An, S. S. A., Von Haller, P., Schaller, J. and Llinás, M. (1997). Ligand preferences of kringle 2 and homologous domains of human plasminogen: Canvassing weak, intermediate, and high-affinity binding sites by <sup>1</sup>H-NMR. *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi971316v.
- McKerrow, J. H., Keene, W. E., Jeong, K. H. and Werb, Z. (1983). Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. I. Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*.

- Miles, L. and Parmer, R.** (2013). Plasminogen receptors: The first quarter century. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. doi: 10.1055/s-0033-1334483.
- Nahum, L. H.** (1964). EPSILON-AMINOCAPROIC ACID (EACA). *Connecticut medicine*. doi: 10.1016/S0140-6736(74)90778-8.
- Nakamura, N., Dai, Q., Williams, J., Goulding, E. H., Willis, W. D., Brown, P. R. and Eddy, E. M.** (2013). Disruption of a Spermatogenic Cell-Specific Mouse Enolase 4 (Eno4) Gene Causes Sperm Structural Defects and Male Infertility<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. doi: 10.1095/biolreprod.112.107128.
- Nava, G., Laclette, J. P., Bobes, R., Carrero, J. C., Reyes-Vivas, H., Enriquez-Flores, S., Mendoza-Hernández, G. and Plancarte, A.** (2011). Cloning, sequencing and functional expression of cytosolic malate dehydrogenase from *Taenia solium*: Purification and characterization of the recombinant enzyme. *Experimental Parasitology*. doi: 10.1016/j.exppara.2011.03.008.
- Navarrete-Perea, J., Toledano-Magaña, Y., De La Torre, P., Sciutto, E., Bobes, R. J., Soberón, X. and Laclette, J. P.** (2016). Role of porcine serum haptoglobin in the host-parasite relationship of *Taenia solium* cysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.05.010.
- Novokhatny, V. V., Kudinov, S. A. and Privalov, P. L.** (1984). Domains in human plasminogen. *Journal of Molecular Biology*. doi: 10.1016/0022-2836(84)90466-2.
- Ogiwara, K., Nogami, K., Nishiya, K. and Shima, M.** (2010). Plasmin-induced procoagulant effects in the blood coagulation: A crucial role of coagulation factors v and VIII. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. doi: 10.1097/MBC.0b013e32833c9a9f.
- Pal-Bhowmick, I., Vora, H. K. and Jarori, G. K.** (2007). Sub-cellular localization and post-translational modifications of the *Plasmodium yoelii* enolase suggest moonlighting functions. *Malaria Journal*. doi: 10.1186/1475-2875-6-45.
- Pancholi, V.** (2001). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi: 10.1007/PL00000910.
- Pancholi, V. and Chhatwal, G. S.** (2003). Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. doi: 10.1078/1438-4221-00283.
- Pearce, J. M., Edwards, Y. H. and Harris, H.** (1976). Human enolase isozymes: electrophoretic and biochemical evidence for three loci. *Annals of Human Genetics*. doi: 10.1111/j.1469-1809.1976.tb00130.x.
- Piast, M., Kustrzeba-Wójcicka, I., Matusiewicz, M. and Banaś, T.** (2005). Molecular evolution of enolase. *Acta Biochimica Polonica*. doi: 10.1016/S.
- Ponting, C. P., Marshall, J. M. and Cederholm-Williams, S. A.** (1992). Plasminogen: A structural review. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. doi: 10.1097/00001721-

199210000-00012.

Principe, M., Borgoni, S., Cascione, M., Chattaragada, M. S., Ferri-Borgogno, S., Capello, M., Bulfamante, S., Chapelle, J., Di Modugno, F., Defilippi, P., Nisticò, P., Cappello, P., Riganti, C., Leporatti, S. and Novelli, F. (2017). Alpha-enolase (ENO1) controls alpha v/beta 3 integrin expression and regulates pancreatic cancer adhesion, invasion, and metastasis. *Journal of Hematology and Oncology*. doi: 10.1186/s13045-016-0385-8.

Pryzdial, E. L. G., Lavigne, N., Dupuis, N. and Kessler, G. E. (1999). Plasmin converts factor X from coagulation zymogen to fibrinolysis cofactor. *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.274.13.8500.

Rajshekhar, V. (2016). Neurocysticercosis: Diagnostic problems & current therapeutic strategies. *Indian Journal of Medical Research*. doi: 10.4103/0971-5916.198686.

Ramajo-Hernández, A., Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Martín, V. and Oleaga, A. (2007). Schistosoma bovis: Plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Experimental Parasitology*. doi: 10.1016/j.exppara.2006.07.003.

Rijken, D. C. (1995). 2 Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Bailliere's Clinical Haematology*. doi: 10.1016/S0950-3536(05)80269-0.

Rijken, D. C. and Lijnen, H. R. (2009). New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x.

Roberto Dominguez and Kenneth C. Holmes (2011). Actin structure and function. *Annual review of biophysics*. doi: 10.1146/annurev-biophys-042910-155359.

Rojas, M., Labrador, I., Concepción, J. L., Aldana, E. and Avilan, L. (2008). Characteristics of plasminogen binding to Trypanosoma cruzi epimastigotes. *Acta Tropica*. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.04.013.

Rosey, E. L., Lincoln, R. A., Ward, P. N., Yancey, R. J. and Leigh, J. A. (1999). PauA: A novel plasminogen activator from Streptococcus uberis. *FEMS Microbiology Letters*. doi: 10.1016/S0378-1097(99)00335-3.

Saavedra, E., Encalada, R., Pineda, E., Jasso-Chávez, R. and Moreno-Sánchez, R. (2005). Glycolysis in Entamoeba histolytica: Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS Journal*. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04610.x.

Sanderson-Smith, M. L., De Oliveira, D. M. P., Ranson, M. and McArthur, J. D. (2012). Bacterial plasminogen receptors: Mediators of a multifaceted relationship. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi: 10.1155/2012/272148.

Santala, A., Saarinen, J., Kovanen, P. and Kuusela, P. (1999). Activation of interstitial

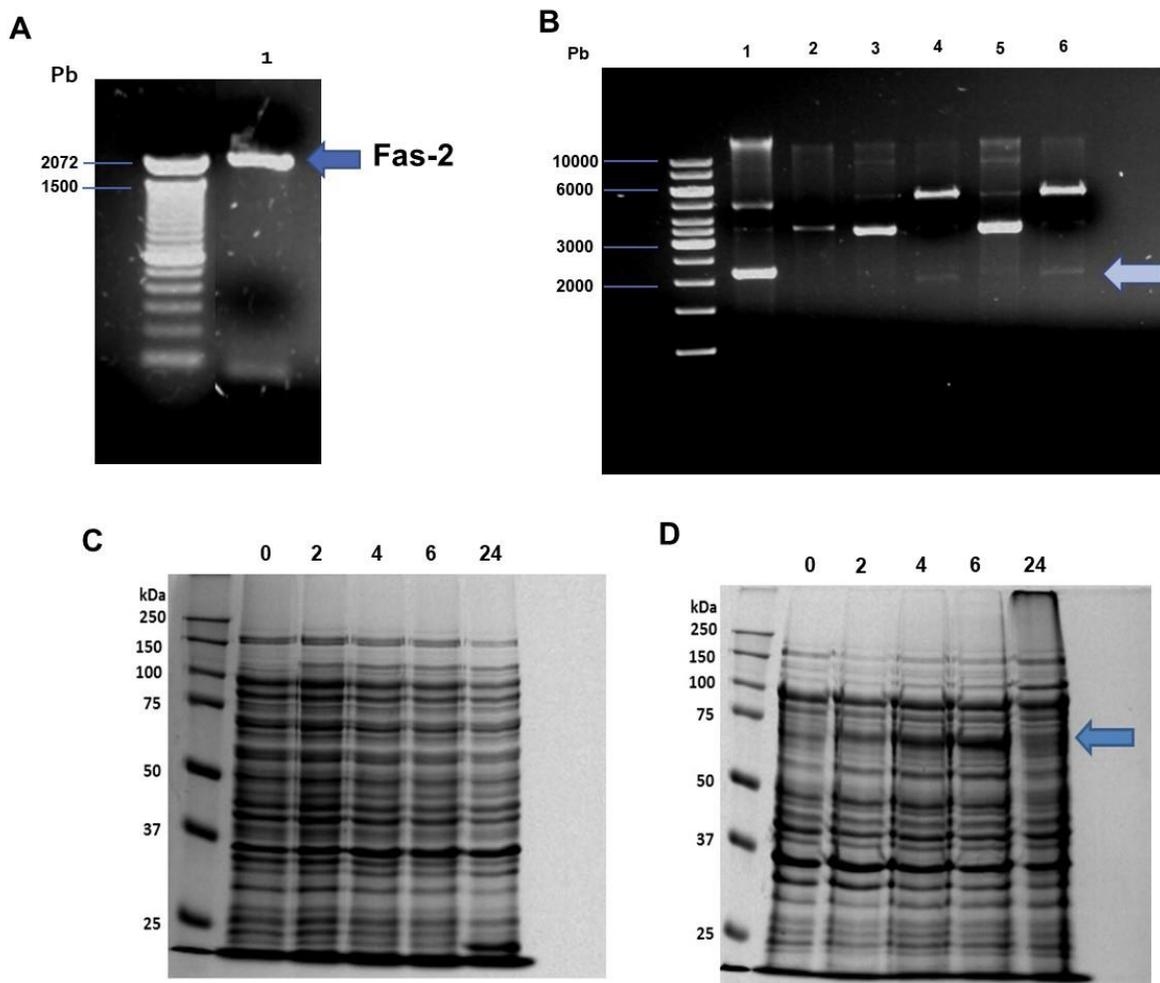
collagenase, MMP-1, by Staphylococcus aureus cells having surface-bound plasmin: A novel role of plasminogen receptors of bacteria. *FEBS Letters*. doi: 10.1016/S0014-5793(99)01440-4.

- Santivañez, S. J., Hernández-González, A., Chile, N., Oleaga, A., Arana, Y., Palma, S., Verastegui, M., Gonzalez, A. E., Gilman, R., Garcia, H. H. and Siles-Lucas, M.** (2010). Proteomic study of activated Taenia solium oncospheres. *Molecular and Biochemical Parasitology*. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.01.004.
- Schmechel, D. and Marangos, P.** (1978). Brain endolases as specific markers of neuronal and glial cells. *Science (New York, ...)*. doi: 10.1126/science.339349.
- Schmechel, D., Marangos, P. J., Zis, A. P., Brightman, M. and Goodwin, F. K.** (1978). Brain enolases as specific markers of neuronal and glial cells. *Science (New York, N.Y.)*.
- Schneiderman, J. and Loskutoff, D. J.** (1991). Plasminogen activator inhibitors. *Trends in Cardiovascular Medicine*. doi: 10.1016/1050-1738(91)90001-U.
- Sciotto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Lacleste, J. P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L. and Larralde, C.** (2000). Taenia solium disease in humans and pigs: An ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection*. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01336-8.
- Shilo, B. Z.** (2014). The regulation and functions of MAPK pathways in Drosophila. *Methods*. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.01.020.
- Singh, B., Fleury, C., Jalalvand, F. and Riesbeck, K.** (2012). Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS Microbiology Reviews*. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00340.x.
- Singh, S., Bhando, T. and Dikshit, K. L.** (2014). Fibrin-targeted plasminogen activation by plasminogen activator, PadA, from Streptococcus dysgalactiae. *Protein Science*. doi: 10.1002/pro.2455.
- Singh, S. K., Singh, A. K., Prasad, K. N., Singh, A., Singh, A., Rai, R. P., Tripathi, M., Gupta, R. K. and Husain, N.** (2015). Expression of adhesion molecules, chemokines and matrix metallo- proteinases (MMPs) in viable and degenerating stage of Taenia solium metacestode in swine neurocysticercosis. *Veterinary Parasitology*. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.09.017.
- Siqueira, G. H., Atzingen, M. V., de Souza, G. O., Vasconcellos, S. A. and Nascimento, A. L. T. O.** (2016). Leptospira interrogans Lsa23 protein recruits plasminogen, factor H and C4BP from normal human serum and mediates C3B and C4B degradation. *Microbiology (United Kingdom)*. doi: 10.1099/mic.0.000217.
- Thibeaux, R., Avé, P., Bernier, M., Morcelet, M., Frileux, P., Guillén, N. and Labruyère, E.** (2014). The parasite Entamoeba histolytica exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms6142.

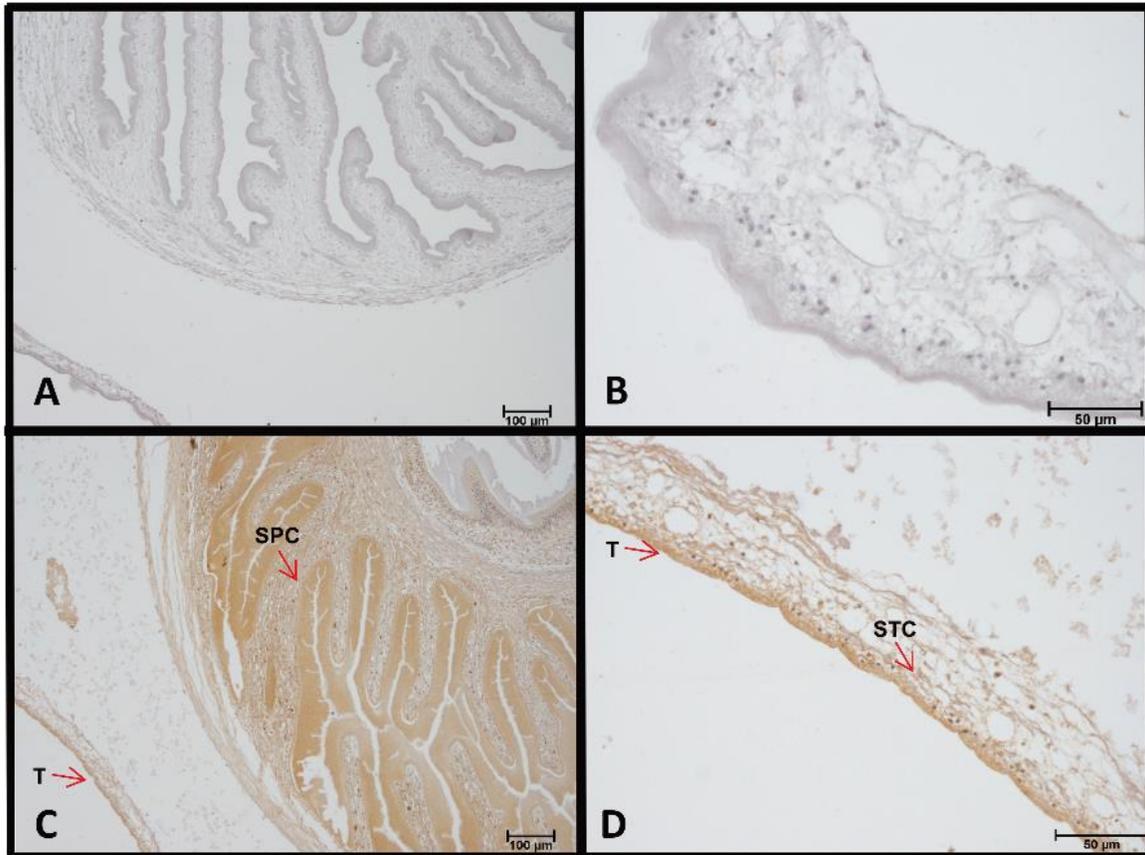
- Tovy, A., Tov, R. S., Gaentzsch, R., Helm, M. and Ankri, S. (2010). A new nuclear function of the *Entamoeba histolytica* glycolytic enzyme enolase: The metabolic regulation of cytosine-5 methyltransferase 2 (Dnmt2) activity. *PLoS Pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1000775.
- Tracy, M. R. and Hedges, S. B. (2000). Evolutionary history of the enolase gene family. *Gene*. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00439-X.
- Tsai, I. J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K. L., Tracey, A., Bobes, R. J., Fragoso, G., Sciutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H. M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T. A., Deplazes, P., Estrada, K., Fernández, C., Holland, P. W. H., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S. S., Kamenetzky, L., Keane, J. A., Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., MacChiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J. D., Zamanian, M., Zheng, Y., Cai, X., Soberon, X., Olson, P. D., Laclette, J. P., Brehm, K., Berriman, M., Morett, E., Portillo, T., Jose, M. V., Carrero, J. C., Larralde, C., Morales-Montor, J., Limon-Lason, J., Cevallos, M. A., Gonzalez, V., Ochoa-Leyva, A., Landa, A., Jimenez, L. and Valdes, V. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*. doi: 10.1038/nature12031.
- Ueta, H., Nagasawa, H., Oyabu-Manabe, Y., Toida, K., Ishimura, K. and Hori, H. (2004). Localization of enolase in synaptic plasma membrane as an  $\alpha\gamma$  heterodimer in rat brain. *Neuroscience Research*. doi: 10.1016/j.neures.2003.12.006.
- Vanegas, G., Quiñones, W., Carrasco-López, C., Concepción, J. L., Albericio, F. and Avilán, L. (2007). Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitology Research*. doi: 10.1007/s00436-007-0668-7.
- Victor, B., Kanobana, K., Gabriël, S., Polman, K., Deckers, N., Dorny, P., Deelder, A. M. and Palmblad, M. (2012). Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion-secretion proteins. *Proteomics*. doi: 10.1002/prot.201100496.
- Wang, X. (1998). Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human Plasmin Complexed with Streptokinase. *Science*. doi: 10.1126/science.281.5383.1662.
- Wang, W. C., Zinn, K. and Bjorkman, P. J. (1993). Expression and structural studies of fasciclin I, an insect cell adhesion molecule. *Journal of Biological Chemistry*.
- Wang, X., Chen, W., Hu, F., Deng, C., Zhou, C., Lv, X., Fan, Y., Men, J., Huang, Y., Sun, J., Hu, D., Chen, J., Yang, Y., Liang, C., Zheng, H., Hu, X., Xu, J., Wu, Z. and Yu, X. (2011). *Clonorchis sinensis* enolase: Identification and biochemical characterization of a glycolytic enzyme from excretory/secretory products. *Molecular and Biochemical Parasitology*. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.02.011.
- Wang, G., Xia, Y., Cui, J., Gu, Z., Song, Y., Chen, Y. Q., Chen, H., Zhang, H. and Chen, W. (2014). The Roles of Moonlighting Proteins in Bacteria. *Current issues in molecular biology*.
- White, A. C., Molinari, J. L., Pillai, A. V. and Rege, A. A. (2006). Detection and Preliminary

- Characterization of *Taenia solium* Metacestode Proteases. *The Journal of Parasitology*. doi: 10.2307/3283475.
- Willms, K., Presas, A. M. F., Jiménez, J. A., Landa, A., Zurabián, R., Ugarte, M. E. J. and Robert, L. (2005). Taeniid tapeworm responses to in vitro glucose. *Parasitology Research*. doi: 10.1007/s00436-005-1348-0.
- Xolalpa, W., Vallecillo, A. J., Lara, M., Mendoza-Hernandez, G., Comini, M., Spallek, R., Singh, M. and Espitia, C. (2007). Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.200600876.
- Yang, J., Qiu, C., Xia, Y., Yao, L., Fu, Z., Yuan, C., Feng, X. and Lin, J. (2010). Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase which is highly expressed at the schistosomulum stage. *Parasitology Research*. doi: 10.1007/s00436-010-1913-z.
- Zhang, Y., Wang, K. H., Guo, Y. J., Lu, Y. M., Yan, H. L., Song, Y. L., Wang, F., Ding, F. X. and Sun, S. H. (2007). Annexin B1 from *Taenia solium* metacestodes is a newly characterized member of the annexin family. *Biological Chemistry*. doi: 10.1515/BC.2007.071.
- Zhang, S., Guo, A., Zhu, X., You, Y., Hou, J., Wang, Q., Luo, X. and Cai, X. (2015). Identification and functional characterization of alpha-enolase from *Taenia pisiformis* metacestode. *Acta Tropica*. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.01.007.
- Zhang, Y., Bae, Y. A., Zong, H. Y., Kong, Y. and Cai, G. Bin (2016). Functionally expression of metalloproteinase in *Taenia solium* metacestode and its evaluation for serodiagnosis of cysticercosis. *Iranian Journal of Parasitology*.
- Zhang, S., You, Y., Luo, X., Zheng, Y. and Cai, X. (2018). Molecular and biochemical characterization of *Taenia solium*  $\alpha$ -enolase. *Veterinary Parasitology*. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.02.041.
- ZHANG, W. and LIU, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*. doi: 10.1038/sj.cr.7290105.

13. FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura suplementaria 1.** Clonación y expresión de Fasciclin-2 de *Taenia solium*. A. Amplificación de Fasciclin-2 con *primers* específicos para la proteína. 1) Amplificado del gen de fasciclina 2 (Flecha azul). B. Clonación de Fasciclin-2 en PET23a. 1) PET23a purificado. 2) PET23a linearizado con las enzimas Hind III y Xho I. 3 y 5) Clonas con el inserto (fasciclina-2). 4 y 6) Liberación del inserto (flecha azul). C. Expresión en bacterias *E. coli* en la fracción soluble. D. Expresión en bacterias *E. coli* en la fracción insoluble. La inducción se realizó con 1 mM de IPTG tomando una alícuota a las 0, 2, 4, 6, 24 horas. La flecha señala la proteína.



**Figura suplementaria 2.** Inmunolocalización de enolasa en cisticerco de *T. solium*. (A, B) Control secundario, las secciones se incubaron solo con un anticuerpo policlonal anti- IgG de cabra acoplado a la peroxidasa. (C, D) Los cortes se incubaron con anticuerpo policlonal anti-enolasa hecho en cabra. Imagen A y C barras: 100μm. Imagen B y D barras: 50μm. T: tegumento, SPC: canal espiral. STC: citones subtegumentales.



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)

## Identification and characterization of *Taenia solium* enolase as a plasminogen-binding protein



Dolores A. Ayón-Núñez<sup>a</sup>, Gladis Fragoso<sup>a</sup>, Clara Espitia<sup>a</sup>, Martín García-Varela<sup>b</sup>, Xavier Soberón<sup>c</sup>, Gabriela Rosas<sup>d</sup>, Juan P. Laclette<sup>a</sup>, Raúl J. Bobes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dept. of Immunology, Institute for Biomedical Research, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

<sup>b</sup> Dept. of Zoology, Institute of Biology, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> School of Medicine, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Taenia solium*  
 Cysticercosis  
 Enolase  
 Plasminogen

### ABSTRACT

The larval stage of *Taenia solium* (cysticerci) is the causal agent of human and swine cysticercosis. When ingested by the host, *T. solium* eggs are activated and hatch in the intestine, releasing oncospheres that migrate to various tissues and evolve into cysticerci. Plasminogen (Plg) receptor proteins have been reported to play a role in migration processes for several pathogens. This work is aimed to identify Plg-binding proteins in *T. solium* cysticerci and determine whether *T. solium* recombinant enolase (rTsEnoA) is capable of specifically binding and activating human Plg. To identify Plg-binding proteins, a 2D-SDS-PAGE ligand blotting was performed, and recognized spots were identified by MS/MS. Seven proteins from *T. solium* cysticerci were found capable of binding Plg: fasciclin-1, fasciclin-2, enolase, MAPK, annexin, actin, and cytosolic malate dehydrogenase. To determine whether rTsEnoA binds human Plg, a ligand blotting was performed and the results were confirmed by ELISA both in the presence and absence of  $\epsilon$ ACA, a competitive Plg inhibitor. Finally, rTsEnoA-bound Plg was activated to plasmin in the presence of tPA. To better understand the evolution of enolase isoforms in *T. solium*, a phylogenetic inference analysis including 75 enolase amino acid sequences was conducted. The origin of flatworm enolase isoforms, except for Eno4, is independent of their vertebrate counterparts. Therefore, herein we propose to designate tapeworm protein isoforms as A, B, C, and 4. In conclusion, recombinant enolase showed a strong plasminogen binding and activating activity *in vitro*. *T. solium* enolase could play a role in parasite invasion along with other plasminogen-binding proteins.

### 1. Introduction

*Taenia solium* is the causative agent of human taeniasis/cysticercosis and porcine cysticercosis, a major health problem and a veterinary economic challenge in developing countries of Latin America, Africa, and Asia. In Mexico, approximately 500 human neurocysticercosis cases were reported in neurological centers between 1994 and 2004 (Sciutto et al., 2000; Fleury et al., 2011, 2012).

Little is known about the molecular mechanisms underlying the early infection events that lead to cysticercosis establishment in the host tissues. While pigs are obligate intermediate hosts in the life cycle of *T. solium* when they are infected with the larval stage of the worm (cysticerci), humans can also be infected by cysticerci; after being ingested by the host, eggs are activated and hatch in the intestine, releasing an hexacanth embryo (oncosphere); the latter crosses the intestinal wall and migrates to several tissues, where it evolves into the larval form

(cysticercus) (Flisser, 2013).

Like many other pathogens, cysticerci developed strategies to favor their establishment and permanence in the host tissues, such as coating its tegument surface with host immunoglobulins (Willms and Arcos, 1997) or modulating host inflammatory and immune responses through various parasite-secreted factors (Damian, 1997; Alvarez et al., 2008; Bobes et al., 2014); furthermore, a host-parasite molecular crosstalk mediated by signaling molecules has been described (Tedford and McConkey, 2017; Singh and Chitmis, 2017; Brehm and Koziol, 2017). Recent reports indicated an extensive uptake of host proteins by *T. solium* cysticerci; these host proteins could play some role in the worm physiology, and this role could be analogous to the one they play in host tissues (Navarrete-Perea et al., 2014).

Binding and activation of plasminogen (Plg) has been proposed as a strategy to favor the migration and establishment of several pathogens (Sanderson-Smith et al., 2012; Verhamme et al., 2015; Figuera et al.,

\* Corresponding author at: Dept. of Immunology, Institute for Biomedical Research, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico.  
 E-mail address: [rbobes@biomedicas.unam.mx](mailto:rbobes@biomedicas.unam.mx) (R.J. Bobes).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.020>

Received 29 August 2017; Received in revised form 13 February 2018; Accepted 15 February 2018

Available online 18 February 2018

0001-706X/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

2013). Plasmin (the activated form of Plg) is an enzyme whose primary function is to degrade fibrin clots produced by the coagulation system (fibrinolysis) to maintain vascular permeability (Lähteenmäki et al., 2001). Plasmin has also been involved in extracellular matrix (EMC) degradation, immune response modulation (Barthel et al., 2012), and its direct participation during invasion in several parasite infections has been proposed (Jolodar et al., 2003; Ghosh and Jacobs-Lorena, 2011; Figuera et al., 2013).

Enolase is a dimeric, multifunctional glycolytic enzyme that catalyzes the interconversion of 2-phospho-D-glycerate and phosphoenolpyruvate in the cell. In some vertebrates, enolases are usually coded by four genes: Eno1, Eno2, Eno3, and Eno4, resulting in different isoenzymes through combinations of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunits (Pearce et al., 1976; Schmechel et al., 1978; Ueta et al., 2004). In humans, four tissue-specific enolase isozymes have been reported: non-neuronal enolase ( $\alpha\alpha$  or Eno1), muscle-specific enolase ( $\beta\beta$  or Eno3), neuron-specific enolase ( $\gamma\gamma$  or Eno2), and sperm-specific enolase (Eno4) (Edwards and Grootegeed, 1983; Nakamura et al., 2013). Enolases have received less attention in invertebrates (Tracy and Hedges, 2000), but they have been found in helminth parasites such as *Onchocerca volvulus* (Jolodar et al., 2003), *Fasciola hepatica* (Bernal et al., 2004), *Echinostoma caproni* (Marcilla et al., 2007), *Schistosoma bovis* (De la Torre-Escudero et al., 2010), and more recently in *Taenia multiceps* (Li et al., 2015) and *T. pisiformis* (Zhang et al., 2015). The existence of isoforms in flatworms is still debated.

Enolases are members of a group of proteins that have been involved in other entirely distinct functions, known as moonlighting proteins (Pancholi, 2001). For instance, enolase has been reported to play a role as plasminogen receptor on the surface of several pathogenic bacteria (Xolalpa et al., 2007; Sanderson-Smith et al., 2012), fungi (Verhamme et al., 2015), and protozoa (Vanegas et al., 2007; Ghosh et al., 2011). Enolases have raised interest as inducers of protective immunity and are considered as potential vaccine candidates in two tapeworm infections (Yang et al., 2010; Chen et al., 2012). The initial goal of this study was to evaluate whether enolase from *T. solium* binds and activates Plg. Our results demonstrated that at least seven *T. solium* proteins, including enolase, are able to bind Plg. An exhaustive analysis *in silico* of the genome database of *T. solium* and other Taeniids showed at least four enolase genes. After a detailed phylogenetic analysis, herein we propose to designate the tapeworm protein isoforms as EnoA, EnoB, EnoC, and Eno4, to emphasize that they are not orthologous to their mammalian counterparts. EnoA was cloned, characterized and expressed in bacteria (rTsEnoA). This recombinant enolase showed a strong Plg binding and activating activity *in vitro*. The potential role of enolases in the host-parasite relation in cysticercosis is discussed.

## 2. Material and methods

### 2.1. Parasites and protein extracts

*Taenia solium* cysticerci were dissected from the skeletal muscle of naturally infected pigs from endemic areas. Cysticerci were washed five times with sterile phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS). Three protein extracts were prepared from cysticerci: cysticercus crude extract (CE), tissue extract (bladder wall and scolex) (TE), and vesicular fluid (VF) as previously described (Navarrete-Perea et al., 2014). Briefly, five cysticerci were sectioned with a scalpel in a Petri dish to separately collect parasite tissue and VF. Pooled VF samples were mixed (1:1 v/v) with lysis buffer and centrifuged at  $16,000 \times g$  for 15 min, whereas cyst tissue and whole cysticerci were mixed 1:3 with lysis buffer. CE and TE were homogenized with a Teflon homogenizer and centrifuged at  $16,000 \times g$  for 15 min. The supernatants of all extracts were recovered; protein content was quantified by a 2-D Quant kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) and frozen at  $-70^\circ\text{C}$  until used.

### 2.2. 1D and 2D/SDS-PAGE

For 1D/SDS-PAGE, 30  $\mu\text{g}$  of each protein extract were dissolved in 0.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 10% SDS, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 1.5% bromophenol blue at  $96^\circ\text{C}$  for 10 min. Electrophoresis was carried out on 12% polyacrylamide gels. Gels were run in a Mini-Protean III (Bio-Rad, Hercules, CA) at a constant current and a 100-V potential. Then, proteins were transferred to PVDF membranes (Millipore, Bedford, MA). For 2D/SDS-PAGE, 150  $\mu\text{g}$  of each proteins extract were precipitated with sodium deoxycholate and trichloroacetic acid; the protein pellet was solubilized and adjusted to a final volume of 125  $\mu\text{L}$  in 8 M urea, 2% CHAPS, and 0.5% IPG buffer pH 3–10 NL (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), and 20 mM DTT. The sample was applied on immobilized pH 3–10 linear gradient strips (7 cm, Bio-Rad) for 16 h after rehydration at room temperature, following the manufacturer's instructions. Focusing started at 300 V for 1 h; then, voltage was increased to 1000 V for 30 min, and finally to 5000 V for 2 h in an Ettan IPG-phor III electrophoresis unit (GE Healthcare). After focusing, strips were equilibrated for 20 min in sample buffer (2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 0.002% bromophenol blue, and 0.5% DTT). Strips were then overlaid onto a 12% SDS-PAGE and proteins were transferred to PVDF membranes for Western and ligand blotting.

### 2.3. Ligand affinity blotting with Plg

To characterize the Plg-binding ability of proteins in CE, PVDF membranes obtained as described above were incubated for 1 h at room temperature with human Plg (Roche), 1:500 in PBS-0.05% Tween-20 (PBS-T) added with 3% BSA, either in the presence or absence of 500 mM *l*-aminocaproic acid (*l*-ACA; Sigma, St. Louis, MO), previously determined as the optimal concentration by a series of dose-response experiments (data not shown). Afterwards, the membranes were washed with PBS-T and incubated for 1 h with a goat polyclonal anti-Plg antibody (Acris antibodies, GmbH, Herford, Germany) diluted 1:1000. Then, membranes were incubated for 1 h with peroxidase-conjugated anti-goat IgG polyclonal antibody (Sigma) diluted 1:3500. The membranes were treated with 3 mg/mL of 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) in PBS-T and 30% hydrogen peroxide diluted 1:1000 to develop color. Negative control reactions were carried out either without Plg or anti-Plg. Plg-binding proteins were identified by MS/MS MALDI TOF/TOF.

### 2.4. Mass spectrometry MS/MS (MALDI TOF/TOF)

To identify Plg-binding proteins in *T. solium* CE, proteins were digested and identified as described elsewhere (Navarrete-Perea et al., 2016). Briefly, the selected protein spots were manually cut from a 2D gel stained with Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad). Staining was removed using ACN: $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM (1:1 v/v) and digested for 18 h at  $37^\circ\text{C}$  with mass spectrometry-grade trypsin (V528A, Promega Corporation, Madison, WI). The peptides thus obtained were extracted in ACN: $\text{H}_2\text{O}$ :formic acid (50:45:5 v/v) and the volume was reduced in a concentrator (Mod. 5301, Eppendorf, Hamburg, Germany). The sample was desalted in a C18 column (ZipTip C18, Millipore, Burlington, MA). Desalted peptides were spotted using  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic as a matrix (10 mg of matrix were dissolved in a solution containing 70% ACN, 29.9%  $\text{H}_2\text{O}$ , and 0.1% TFA). The peptides were spotted twice by triplicate (three samples were processed with CID in mode ON and all other samples with CID in mode OFF) and analyzed using a MALDI-TOF-TOF 4800 instrument (ABSciex, Framingham, MA). The instrument was operated in positive ion mode and calibrated with standards ranging from 900 to 3600 Da (ABSciex TOF/TOF). Laser power was set to 2500–2800 for MS and 3500–3800 for MS/MS acquisition. The fragmentation of automatically selected precursors was performed in MS-positive reflector mode using 25 laser shots at a collision energy of 2 kV, using air as collision gas (at  $2 \times 10^{-6}$  Torr) with an accumulation

of 400 shots for each spectrum. MS spectra were acquired in the range 800–4000 *m/z*. The parental ion of Glu<sup>1</sup>-Fibrino-PeptideB was used for internal calibration at *m/z* = 1570.690 Da diluted in the matrix (1.3 pmol/μL/spot). Up to 16 of the most intense spot signals with a S/N ratio > 20 were selected as precursors for MS/MS acquisition. Peptide and protein identification was performed with the Protein Pilot™ software version 2.0 (AB Sciex), using the Paragon algorithm as the search engine. Each MS/MS spectrum was searched against the *T. solium* genome database. Searches were run using the carbamidomethyl modification of cysteine residues as a fixed setting. The detected protein threshold unused protscore (confidence) was set to 0.47 to achieve a 66%-confidence.

### 2.5. Immunolocalization studies

For immunohistochemical localization of enolase in tissue, cysticerci were fixed in paraformaldehyde to be included in paraffin blocks. Serial 5-μm-thick sections were obtained and fixed onto microscope slides. Tissue sections were deparaffinized by incubation at 50 °C for 30 min, followed by two baths in xylene and decreasing ethanol graduation. Then, sections were blocked with 0.1% bovine serum albumin in PBS-T for 10 min. A goat polyclonal anti-human α-enolase antibody (C-19, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), diluted 1:50 was added to tissue sections at room temperature for 1 h. After three washings with PBS-T, sections were incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated anti-goat IgG polyclonal antibody (Sigma) diluted 1:2000 for 30 min. The reaction was developed using 3 mg/mL of 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) in PBS-T and 30% hydrogen peroxide diluted 1:1000, and counterstained with hematoxylin/eosin. Finally, all sections were mounted with synthetic resin to be observed and photographed under a light microscopy. Serial sections of each tissue sample were incubated in parallel without primary antibody to check for un-specific binding of the secondary antibody.

### 2.6. Enolase immunologic identification by Western blot

Proteins blotted on PVDF membranes from 1D and 2D/SDS-PAGE were blocked with 3% BSA in PBS-T for 1.5 h, washed with PBS-T, and incubated for 2 h with goat polyclonal anti-enolase antibody (Santa Cruz Biotechnologies) 1:500 both for 1D/SDS-PAGE and 2D/SDS-PAGE. The membranes were washed with PBS-T and incubated for 1 h with horseradish peroxidase-coupled anti-goat IgG polyclonal antibody (Sigma) diluted 1:2000. The reaction was developed as described above. Control membranes, incubated without anti-enolase antibody, were also included.

### 2.7. *T. solium* enolase cloning, recombinant expression, and purification

The In-Fusion Cloning Kit HD (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) was used to clone the *T. solium* enolase coding sequence TsEno1, following manufacturer instructions. Briefly, the pET-23a (+) vector (Novagen, Madison, WI) was linearized by restriction-enzyme digestion. Fifteen-base-pair primers homologous to vector ends, including restriction sites for BamHI and NotI (Table 1) were designed and synthesized to amplify the coding sequence for enolase. Total RNA was isolated from *T. solium* cysticerci using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Superscript II RNase H–reverse transcriptase (Invitrogen) was used for RT with a 1-μg RNA sample. The coding sequence for enolase was amplified by PCR and bound to a plasmid vector with the cloning kit. BL21 competent cells were transformed with the recombinant plasmid, and the expression of recombinant *T. solium* enolase (rTsEnoA) was induced with 1 mM IPTG at 37 °C for 6 h. Induced cells were harvested and lysed in a buffer containing 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 100 mM NaCl and 1 mM EDTA. Histidine-tagged rTsEnoA was purified by affinity chromatography in an ÄKTAprius plus system (GE Healthcare Life Sciences). Finally, rTsEnoA recognition was assessed by

**Table 1**  
Primer pairs for the PCR amplification of enolase isoforms.

TsEno1	F: 5'AATGGGTGCG/GGATCC/ATGTCCATCCAAAAGATTCATGC R: 5'TGCTCGAGT/GCGGCCGC/CAAAGGATTGCGGAAGTGCTC
TsEno2	F: 5'AATGGGTGCG/GGATCC/ATGGGATGCTAAGAATTGTG R: 5'TGCTCGAGT/GCGGCCGC/TTTGATAGGGTTAATATGTGC
TsEno3	F: 5'AATGGGTGCG/GGATCC/ATGAAATCTATCATTGACAGCC R: 5'TGCTCGAGT/GCGGCCGC/AGGATGGCGGAAATTTTTCG
TsEno4	F: 5'AATGGGTGCG/GGATCC/ATGAAACAACAGCTCGATAATG R: 5'TGCTCGAGT/GCGGCCGC/CTCACATTCACCCAGAG

Western blot as described above, using mouse monoclonal antibody (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) directed to the his<sub>6</sub>-tag of the recombinant product, diluted 1:4000, as well as a goat anti-enolase antibody (see above) diluted 1:1000.

### 2.8. Plasminogen binding assays (rTsEnoA)

Polystyrene microplates (Corning Costar, Sigma-Aldrich) were coated by overnight incubation at 4 °C with either 1 μg of rTsEnoA or 3 μg of CE per well, using a 0.05 M bicarbonate/carbonate buffer pH 9.6. Then, the plates were washed three times with PBS-T and blocked with PBS-T added with 1% gelatin (PBS-T-Gel) for 1 h at 37 °C. After a second wash with PBS-T, 4 μg of human Plg in 100 μL of PBS-T-Gel were added to each well and incubated for 1 h. Microplates were washed three times with PBS-T, incubated for 1 h with goat polyclonal anti-Plg antiserum (Acris Antibodies) (1:1000), and then incubated for 1 h with peroxidase-conjugated anti-goat IgG polyclonal antibody (Sigma) 1:1500. Peroxidase activity was revealed with 100 μL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) single solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); the reaction was stopped by adding 100 μL of 1 N hydrochloric acid. The plasminogen inhibitor εACA was added to some assay mixtures at a final concentration of 40 mM. Negative controls included plates without rTsEnoA or CE, as well as coated with gelatin only (1 μg per well, the same as rTsEnoA). Every condition was assayed in duplicate and all assays were repeated at least three times.

### 2.9. Plg activation assays (rTsEnoA)

Plg activation was assessed by measuring the production of 4-nitroaniline using Chromozym PL (Roche Diagnostics) as a substrate for plasmin. To determine whether Plg was activated by rTsEnoA, polystyrene microplates were coated with either 10 μg of rTsEnoA or 4 μg of CE in bicarbonate/carbonate buffer pH 9.6. After washing as described above, wells were blocked with PBS-T-Gel for 1 h at 37 °C. Then, 4 μg of Plg in 100 μL of PBS-T-Gel were added to each well and incubated for 1 h at 37 °C. Wells were rinsed three times and incubated with 15 ng of tPA (Calbiochem, San Diego, CA) and 0.5 mM Chromozym PL in 200 μL (final volume) of 50 mM Tris buffer pH 7.4. Absorbance at 405 nm was determined at room temperature at 15 and 30 min, and thereafter every hour for 24 h. The plasminogen inhibitor εACA was added to some assays at a final concentration of 40 mM. Control assays either without Chromozym PL, Plg, rTsEnoA, or tPA were included. Every condition was assayed in duplicate and all assays were reproduced at least three times.

### 2.10. Phylogenetic analysis

Enolase isoform sequences were downloaded from the GenBank and GeneDB datasets (<http://www.genedb.org/homepage>). *T. crassiceps* sequences were obtained as unpublished data and were deposited in GenBank; all sequences and accession numbers are provided in Supp. Fig. 2. The sequences were aligned using the Clustal W software (Thompson et al., 1997). A maximum likelihood (ML) analysis was

performed using the RAxML software v.7.0.4. (Stamatakis, 2006). A GTRGAMMAI substitution model was selected for ML analyses, with 10,000 bootstrap replicates.

### 2.1.1. Enolase isoform cysticercus expression determined by RT-PCR

Total RNA from *T. solium* cysticerci was purified as described above. Appropriate primers were designed based on the TsEno2, TsEno3, and TsEno4 nucleotide sequence (Table 1) for specific RT-PCR analysis for each enolase gene. Enolase genes were amplified by PCR with the HotStar<sup>®</sup> Taq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) under the following conditions: Initial activation at 95 °C for 5 min, followed by 35 denaturation cycles at 94 °C for 60 s, annealing for 15 s at 64 °C for Eno1, 58 °C for Eno2 and Eno4, 60 °C for Eno3, and a final extension at 72 °C for 60 s. Amplicons were resolved in 1% agarose gels for visualization.

### 2.1.2. Statistical analysis

Differences between groups were evaluated using a Kruskal-Wallis test, nonparametric ANOVA. Differences were considered as statistically significant for  $P < 0.05$ . All analyses were performed with the InStat software (GraphPad, La Jolla, CA).

## 3. Results

### 3.1. Plg-binding *T. solium* proteins

A Plg-CE ligand blotting was carried out. Initially, protein extracts were resolved by 2D/SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. About 300 protein spots were detected in CE by Coomassie blue staining (Fig. 1A). At least 48 reactive Plg-binding spots were detected; since these assays were performed by triplicate, only those Plg-binding spots that were positive in all three assays were considered as valid. A representative image is shown in Fig. 1B. Ligand blot assays were also performed in the presence of *e*ACA, a Plg competitive inhibitor, at a final concentration of 500 mM. *e*ACA decreased significantly the interaction of several positive spots with Plg (Fig. 1C). Twenty-one spots were manually cut from the 2D gel and analyzed by mass spectrometry. Seven proteins were identified (Table 2): fasciclin 1 and 2, enolase, mitogen activated protein kinase (MAPK), annexin, actin, and cytosolic malate dehydrogenase. Two 47-kDa spots with identical sequences and high coverages (55 and 76%) were identified as enolase by blast searches in public databases (see below). To confirm that these 47-kDa spots correspond to enolase, 1D and 2D Western blot assays were performed with the three cysticerci protein extracts, using a polyclonal

**Table 2**  
Identification of plasminogen-binding proteins in *Taenia solium* cysticerci by MS/MS (MALDI TOF/TOF).

Protein	Spot No. Fig. 2	Access ID	% Cov	No. Peptides
Fasciclin 1	1	TsM_000655200	17.9	13
Fasciclin 1	2	TsM_000655200	21.4	14
Fasciclin 2	3	TsM_000825900	8.4	4
Fasciclin 2	4	TsM_000825900	10.5	4
Fasciclin 2	5	TsM_000825900	8.5	3
Enolase	6	TsM_000595600	76.44	14
Enolase	7	TsM_000595600	54.97	13
MAPK	8	TsM_000212400	10.6	6
MAPK	9	TsM_000212400	3.9	8
Annexin	10	TsM_000024300	17.4	5
Fasciclin 1	11	TsM_000655200	15.1	13
Annexin	12	TsM_000024300	26.1	7
Annexin	13	TsM_000024300	6.8	2
Actin	14	TsM_000781200	17.8	5
Actin	15	TsM_000781200	20.2	6
cMDH	16	TsM_000048200	23.7	7

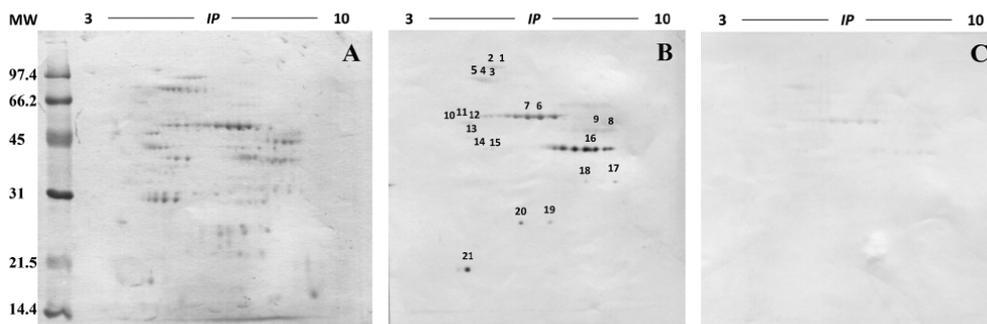
Note. MAPK: Mitogen activated protein kinase, cMDH: Malate dehydrogenase cytosolic. No. Number. Cov: Coverage.

antiserum directed to alpha-, beta-, and gamma-enolase. A single 47-kDa band was identified in the 1D blots (Supp. Fig. 1); moreover, several spots in 2D blots were aligned with the two sequenced 47-kDa spots (6 and 7, Table 2). Both findings suggest the presence of isoforms or post-translationally modified enolases in crude cysticercus extracts.

Initially, the blastp searches in public databases suggested that the amino acid sequence determined by MS corresponded to *T. solium* enolase. However, an exhaustive analysis *in silico* of the enolase gene in *T. solium* genome database and in databases for other Taeniid tapeworms revealed at least four enolase genes; initially designated as Eno1, Eno2, Eno3, and Eno4, they are orthologues of the four genes were also identified for *T. crassiceps*, *Echinococcus multilocularis*, and *E. granulosus*. Finally, orthologues for Eno1 and Eno4 were also identified for *Hymenolepis microstoma*.

### 3.2. Phylogenetic analysis of enolases

To better understand the evolution of enolase isoforms, a phylogenetic analysis of 75 sequences representing 46 taxa, including flatworms, bacteria, fungi, plants, invertebrates, and vertebrates, was performed (Supp. Fig. 2). The phylogenetic analysis yielded a single (most likely) tree (Fig. 2) with a length  $-\ln$  of 24279; vertebrate and invertebrate Eno4 sequences were clustered as sister group for all other enolases. Within vertebrates, the order of emergence of enolase isoforms was  $\alpha$  (Eno1),  $\beta$  (Eno3), and  $\gamma$  (Eno2); among invertebrates, the



**Fig. 1.** Plasminogen-binding assay on a crude extract (CE) from *T. solium* cysticerci. After 2D SDS-PAGE (IP: 3–10), proteins were transferred to PVDF membranes. (A) Coomassie blue staining after 2D SDS-PAGE; other membranes were incubated with human plasminogen either in the absence (B) or presence (C) of *e*ACA. Plasminogen-binding proteins indicated by numbers were identified by MS/MS MALDI TOF/TOF. Left lanes show MW markers.

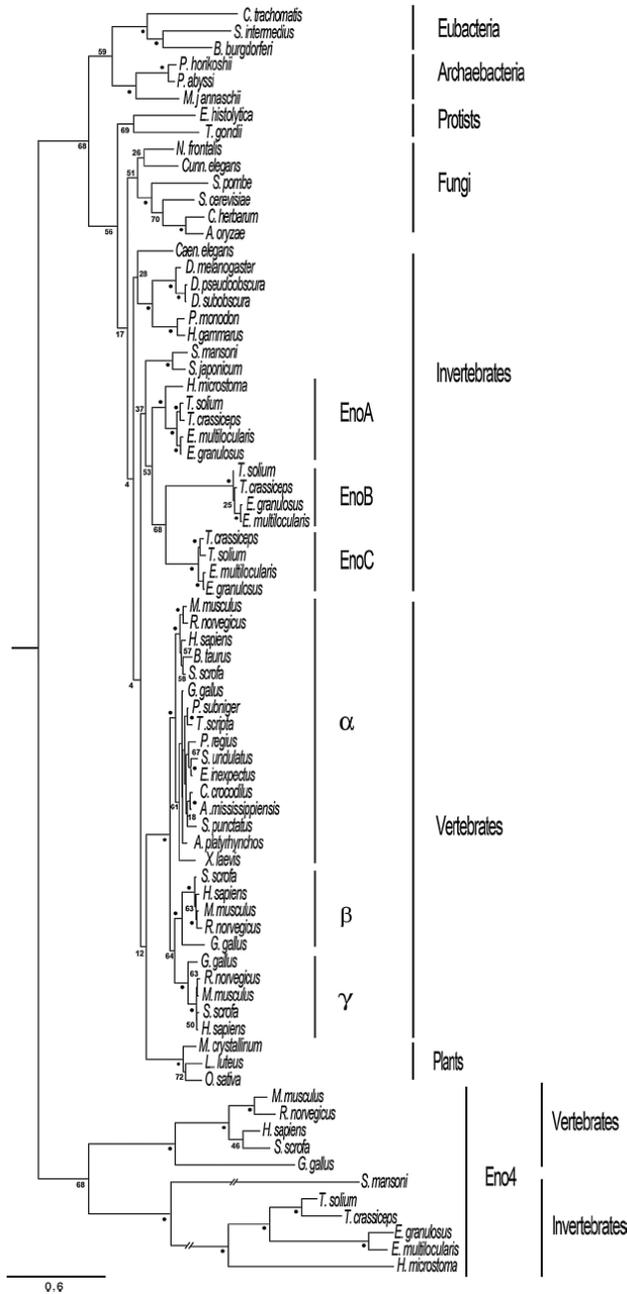


Fig. 2. Maximum likelihood tree inferred for enolase isoforms. Bootstrap support values are shown near the nodes. Bootstrap support of 75–100% are marked with a dot. All sequences and accession numbers used in this phylogenetic analysis are shown in Suppl. Fig. 2.

order of emergence was Eno1, Eno2, and Eno3. Another clade included a different enolase isoform from Eubacteria, Archaeobacteria, Protist, Fungi, and Plants. In addition, *T. solium* and its sister species, *T. crassiceps*, expressed four enolase isoforms.

The phylogenetic analysis (Fig. 2) showed that, except for Eno4, the tapeworm enolase amino acid sequences were not orthologues of the vertebrate isoforms; thus, enolase isoforms in vertebrates and invertebrates are not monophyletic. Therefore, to differentiate vertebrate from invertebrate enolase isoforms we propose to designate the proteins coded by orthologue genes for Eno1, Eno2, and Eno3 as A, B, and C, respectively. Because Eno4 in all tapeworms was orthologue to vertebrate Eno4 genes, we propose to keep this term. It should be noticed that TsEnoA was 433 amino acid residues long, TsEnoB was 438 aa-long, and TsEnoC was 450 aa-long, whereas TsEno4, as well as other tapeworm orthologues were around 250 residues long, an atypical size compared with mammalian orthologous isoforms. With respect to the identity in amino acid sequence among the four enolase isoforms in *T. solium*, EnoC was 74% identical to EnoA; EnoB was 67%; and Eno4 was 26% identical, as shown in Supp. Fig. 5.

### 3.3. *T. solium* enolase isoforms gene expression

To explore the expression of *T. solium* enolase isoform genes, RT-PCR assays on total cysticercus RNA were performed, using specific primer pairs for each isoform. TsEnoA (1299 bp) was strongly detected in cysticercus total RNA, while detection of TsEnoC and TsEno4 (1293 and 753 bp, respectively) was less intense (Supp. Fig. 3). In contrast, no amplification product was detected for TsEnoB (1314 bp).

### 3.4. Plasminogen-binding motif in TsEnoA and immunolocalization in *T. solium* cysticercus tissues

Since TsEnoA seemed to be the enolase isoform with the highest expression in cysticerci, all subsequent enolase-Plg characterization studies were performed on this isoform. The amino acid sequence of TsEnoA was aligned using the MultAlin tool (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) with other available enolase sequences: *T. multiceps*, *T. pisiformis*, *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *Schistosoma bovis*, and *F. hepatica* (Fig. 3). All sequences showed identity values higher than 70%, indicating highly conserved sequences among flatworm enolases. Additionally, the Plg-binding motif reported for enolases from many organisms, including parasites and bacteria (Bernal et al., 2004; Ehinger et al., 2004; Bergmann et al., 2005; Vanegas et al., 2007), was also found in *T. solium* (<sub>251</sub>FYQDGKYNL<sub>259</sub>). This motif can vary in position along the enolase amino acid sequence among different organisms (Ehinger et al., 2004; Figuera et al., 2013).

Immunolocalization studies using polyclonal antiserum against enolases were conducted. As shown in Fig. 4, an intense positive signal for enolase was detected in bladder wall tegument, as well as in the spiral canal of invaginated scolex. Additionally, positive staining was also observed in subtegumental cytons of the bladder wall.

### 3.5. Cloning, recombinant expression and purification of rTsEnoA

The complete coding sequence for TsEno1 was PCR amplified and ligated into the expression vector PET23a. After sequencing the inserted DNA fragment to verify that the reading frame was in phase within the plasmid, BL21 cells were transformed. Transformed cells were induced to express by treatment with IPTG, and the recombinant poly-his-tagged rTsEnoA, representing about 50% of the total protein in induced bacteria (as estimated by densitometry of dry gels) was purified by Ni<sup>2+</sup>-binding affinity chromatography from a soluble extract. Purified rTsEnoA was resolved at 47 kDa in SDS-PAGE, consistent with the expected molecular mass (Supp. Fig. 4A). Purity of the isolated recombinant product was higher than 90%. Western blotting with polyclonal antibodies recognizing all isoforms of mammalian enolases, as

well as antibodies directed to the histidine tag (Supp. Fig. 4B), demonstrated the recognition of two protein bands in the gels; the major one, at 47 kDa, apparently corresponded to monomeric rTsEnoA, and a second and less intense band at 90 kDa might correspond to dimeric rTsEnoA.

### 3.6. Plg-binding and activation by rTsEnoA

Ligand blots and ligand-ELISA were performed to determine whether purified rTsEnoA retained the ability to bind Plg as previously observed in *T. solium* cysticercus crude extracts (see above). According to the ligand assay on 1D gels, the anti-Plg antiserum used to detect Plg binding strongly reacted with the 47-kDa band. Again, the use of eACA in the ligand blotting greatly reduced Plg-rTsEnoA binding (Fig. 5A). Parallel ELISA testing using rTsEnoA to coat microplate wells also demonstrated Plg binding (Fig. 5B). Although the results from both assays are not comparable in terms of quantity, both suggested that the Plg-rTsEnoA binding was specific. Competition with eACA seemed to be more efficient in the ligand blotting assays; this discrepancy could be explained considering that the spatial arrangement of rTsEnoA is different when attached to ELISA plates and the PVDF membrane. It is possible that lysine residues on rTsEnoA, that are essential for Plg binding, are differentially exposed in both assays, resulting in differing inhibition levels by eACA.

To determine whether Plg-rTsEnoA binding resulted in the production of plasmin, assays were performed with immobilized rTsEnoA. rTsEnoA-bound Plg became slightly activated to plasmin in the presence of tPA (Fig. 5C).

## 4. Discussion

Cysticerci located in host tissues are exposed to several effector mechanisms of the immune system (Flisser et al., 1986; Sciuotto et al., 2000; Amit et al., 2011; Singh et al., 2013). In addition, the extensive uptake of host proteins by cysticerci has led to the proposal that these proteins could play a role in the worm physiology. A striking example is porcine serum haptoglobin, which seems to modulate the host-parasite relation in *T. solium* cysticercosis (Navarrete-Perea et al., 2014, 2016). The survival of *T. solium* metacystode in host tissues depends on several mechanisms to evade or modulate the host immune response (Baig et al., 2005; Sciuotto et al., 2007; Terrazas, 2008; Mendlovic et al., 2015). Little is known about the mechanisms used by *T. solium* to migrate in early stages of infection and establish in different host tissues. The establishment of *T. solium* cysticerci in the central nervous system may represent an advantage for the survival of the parasite in this tissue with a privileged immune status (García et al., 2004; Sciuotto et al., 2007). Understanding the role that several cysticercus proteins play in parasite migration and establishment will provide us with a more comprehensive view of the survival mechanisms applied by cysticerci lodged in host tissues. Enolase, a glycolytic enzyme, has been recently described as a potential vaccine candidate (Yang et al., 2010; Chen et al., 2012), since it is highly expressed in cysticercus tegument, and has been proposed to play a role in the maintenance of host-parasite relation through its Plg-activating ability, already described for *T. pisiformis* (Zhang et al., 2015).

Four enolase genes have been described for vertebrates: Eno1, Eno2, Eno3, and Eno4 (Pearce et al., 1976; Schmechel et al., 1978; Ueta et al., 2004). However, invertebrate enolase gene diversity has not been characterized. Four tapeworm enolase genes were identified in public genome databases. Coincidentally, four genes have also been described in vertebrate organisms. However, few studies on enolase evolution are available (Tracy and Hedges, 2000; Harper and Keeling, 2004; Piast et al., 2005), and these studies included few examples of invertebrate enolases. Thus, to the best of our knowledge, no evidence on the relation between vertebrate and invertebrate enolase isoforms was available. This fact led us to conduct a new phylogenetic analysis that

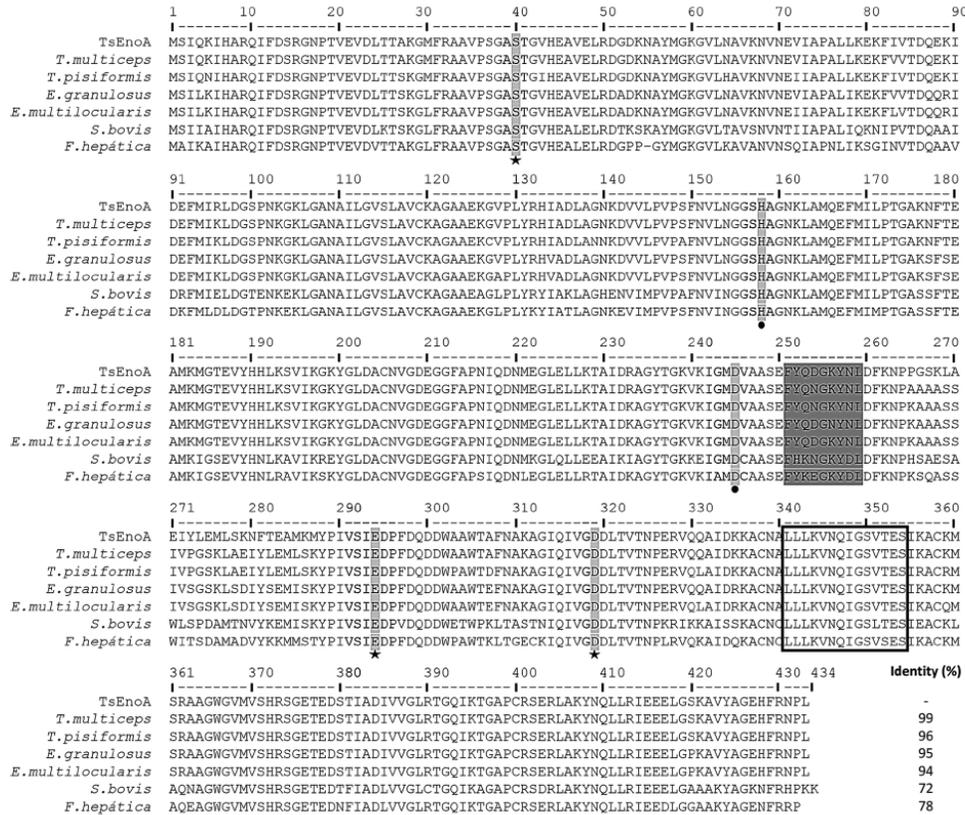


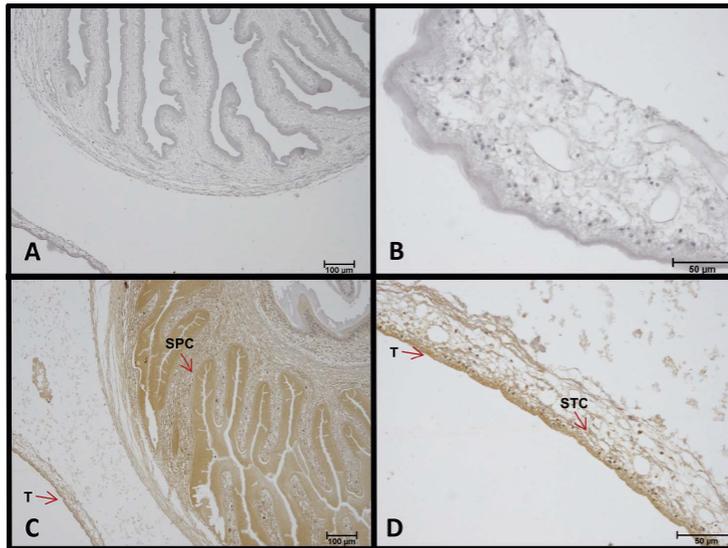
Fig. 3. Alignment of the amino acid sequences of enolase A from *Taenia solium* (AHB59732.1) with related parasites. *Taenia multiceps* (ACX56268.1), *Taenia pisiformis* (ACX56268.1), *Echinococcus granulosus* (ACY30465.1), *Echinococcus multilocularis* (ACY30465.1), *Schistosoma bovis* (ACC78611.1), and *Fasciola hepatica* (CAK47550.1). The gray background shows the plasminogen-binding putative motif (Bergmann et al., 2003); the box shows the motif characteristic of enolases; metal binding sites are marked with stars; circles show well characterized substrate-binding residues.

included 75 enolase amino acid sequences from organisms belonging to six kingdoms. ML phylogenetic analysis showed that *T. solium* and other tapeworms have four enolase isoforms (Fig. 2). The topology of our tree showed that the origin of enolase isoforms in vertebrates, except for Eno4, is independent of the enolase isoforms in invertebrates (Fig. 2). Herein we propose a new designation (EnoA, EnoB, EnoC, and Eno4) to emphasize that invertebrate enolase isoforms are not orthologues of their vertebrate counterparts.

Three of the *T. solium* enolase isoforms (TsEnoA, TsEnoB and TsEnoC) were 433–450 amino acid residues long, whereas TsEno4 was about 40% smaller: 250 residues long. It is noteworthy that this enolase lacks the Plg-binding motif. Studies to determine whether this isoform, clearly expressed in cysticerci, retains its Plg-binding activity are currently underway. With respect to the gene expression level of the enolase isoforms in *T. solium* cysticerci, RT-PCR assays using primer pairs specific for each isoform showed that TsEnoA, TsEnoC and TsEno4 were clearly expressed, while no TsEnoB was detected, possibly because it is expressed in another stage of the parasite life cycle, like the oncosphere or the adult worm. A line of evidence supporting a high expression of TsEnoA is given by a random sequencing of 75 000 ESTs from *T. solium* cysticerci and adults (Tsai et al., 2013, <http://www.genedb.org/Homepage/Tsolium>); 674 hits for TsEnoA were recorded in cysticercus ESTs, whereas only one hit was reported for Eno4 (data not

shown). The high expression of TsEnoA could be due to its involvement in glycolysis, a key metabolic process for *T. solium*, since this parasite is well known for its high glucose consumption (Willms et al., 2005).

In agreement with the evidence on the Plg-binding function of tapeworm enolases, eukaryotic enolases have been shown to be multifunctional proteins, with other activities besides their role as glycolytic enzymes (Pancholi, 2001). In this respect, several flatworms have been proved to express enolase as a tegumentary protein; its exposure on the external surface has also been suggested (Jolodar et al., 2003; De la Torre-Escudero et al., 2010; Wang et al., 2011; Figueiredo et al., 2015; Zhang et al., 2015). Other reports have found enolase as an excretion/secretion (E/S) protein in several flatworms, including *T. solium* (Bernal et al., 2004; Hewitson et al., 2009; Virginio et al., 2012; Victor et al., 2012). In any case, either as E/S products or as surface proteins, enolases have been associated to Plg binding and activation during parasite invasion of the host tissues (Ghosh and Jacobs-Lorena, 2011; González-Miguel et al., 2012, 2015). In this study, we confirmed that *T. solium* enolase shows a widespread distribution in cysticercus tissues (Fig. 4); in the bladder wall, enolase was detected in the tegument and in subtegumental cytons that are assumed to elaborate E/S products to be sent to the tegument; in the invaginated scolex, enolase was clearly present in the tegument of the spiral canal and other cellular compartments. This widespread tissue distribution is compatible with both



**Fig. 4.** Immunohistochemical localization of enolase on tissue sections of *T. solium* cysticerci. (A, B) As a secondary control, sections were incubated only with an anti-goat IgG polyclonal antibody coupled to horseradish peroxidase. (C, D) Sections were incubated with goat polyclonal anti-enolase antibody, followed by anti-goat IgG polyclonal antibody coupled to horseradish peroxidase. Image A, C bars: 100 µm. Image B, D bars: 50 µm. T: tegument, SPC: spiral canal. STC: subtegumental cytons.

an enzyme with a metabolic role and a protein involved in host-parasite interplay. The antibody used in immunolocalization studies clearly recognized TsEnoA, as demonstrated by mass spectrometry and Western blot assays. In contrast, it failed to recognize TsEno4, and this was then confirmed by Western blot. However, the possibility of cross-reaction at least with TsEnoC cannot be ruled out, considering that TsEnoB did not seem to be expressed in cysticerci.

Ligand blotting assays demonstrated that *T. solium* cysticerci expressed several proteins with Plg-binding properties (Fig. 1B). Plg ligands have been reported as involved in the pathogenesis of other parasites (Ghosh et al., 2011; González-Miguel et al., 2013). The role of *T. solium* enolase as a Plg-binding protein was initially suggested by its identification in Plg-binding spots in the 2D/SDS-PAGE, by MS (Table 2). The high coverage of the amino acid sequence determined by MS for spots 6 and 7 allowed identification of TsEnoA. In contrast, TsEnoB, TsEnoC, and TsEno4 were not detected. The other Plg-binding proteins found in *T. solium* cysticerci (fasciclin 1 and 2, MAPK, anexin, actin, and cytosolic malate dehydrogenase) require detailed characterization studies for their involvement on Plg activation.

TsEnoA contains 433 amino acid residues in a sequence that shows high identity with enolases from other Taeniid parasites (*T. multiceps*: 99%, *T. pisiformis*: 96%, *E. granulosus*: 95%, and *E. multilocularis*: 94%); identity rates with other plathelminths like *Fasciola* spp. and *Schistosoma* spp. ranged from 78 to 72%. This highly conserved amino acid sequence was expected, considering the crucial metabolic role of this and other glycolytic enzymes (Pancholi, 2001).

Previous studies on enolase sequences, including helminth parasites, have proposed that Plg binding involves an internal motif such as <sup>248</sup>FYDKERKVVY<sub>256</sub>, described for bacteria (Bergmann et al., 2003; Ehinger et al., 2004; Bernal et al., 2004; Vanegas et al., 2007; Ghosh et al., 2011). A putative Plg-binding motif was also identified in TsEnoA: <sup>251</sup>FYQDGRKYNL<sub>259</sub> (Fig. 3).

Equivalent ligand blotting assays (Fig. 5A) and other determinations confirmed the Plg-binding ability of rTsEnoA (Fig. 5B). The competitive inhibitor εACA also apparently decreased Plg-enolase binding. rTsEnoA was also demonstrated to increase Plg activation by tPA more than twice, suggesting that enolase potentiates the action of this physiological plasminogen activator (Fig. 5C). Only a small decrease in Plg

activation by tPA was observed when the competitive inhibitor εACA, that blocks Plg binding to exposed lysine residues, was added to the reaction mixture, suggesting that Plg binding and activation by rTsEnoA did not significantly involve lysine residues. Clearly, εACA is not an adequate Plg binding inhibitor for TsEnoA, in agreement with reports about enolase in other pathogenic organisms (Rojas et al., 2008; Floden et al., 2011; Zhang et al., 2015). Exploration through directed mutagenesis could shed some light on this possibility.

Information on the mechanism by which parasite infections promote ECM degradation is limited (McKerrow et al., 1983; Andrade, 1994; Lu and Lai, 2013; Thibeaux et al., 2014). The interaction of plasminogen-plasmin with proteins of microorganisms, including bacteria, has been suggested to play a key role in the degradation of ECM, acting on several ECM proteins including fibronectin, laminin and thrombospondin (Bergmann et al., 2005; Bhattacharya et al., 2012; Singh et al., 2012; Grossi et al., 2016). Also in parasites, it has been proposed that loosening the ECM can facilitate parasite migration in the host tissues during early stages of infection, as well as its establishment in a final location (Singh et al., 2015; González-Miguel et al., 2015). We can speculate that degradation of the ECM could allow the cysticercus to grow and survive. The enolase-plasminogen interaction could be one (among others) of the mechanism used by the parasite. While the presence of enolase binding and activating Plg (in the presence of tPA) was documented in this study for the larval stage of *T. solium*, enolases and other promoters of Plg activation could also be present in the human infective stage (oncosphere), which could reach several host tissues and develop into the larval stage. Previous studies showed that enolase, among other proteins, are expressed in the proteome of *T. solium* activated oncospheres (Santivañez et al., 2010). Studies to ascertain whether enolase is involved in the degradation of extracellular matrices are ongoing. If involved, they could be a major factor contributing to the parasite establishment in host tissues. It is also conceivable that one of the isoforms of enolase in *T. solium* could be more involved than others in Plg-binding.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

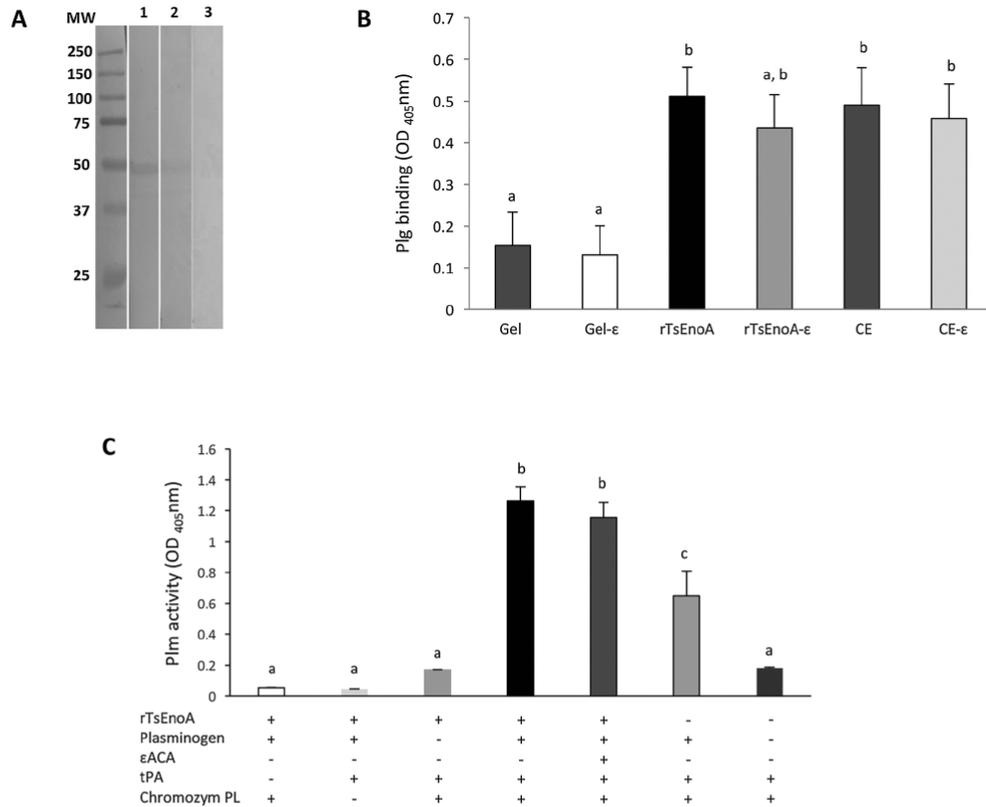


Fig. 5. Plasminogen-binding and activation by rTsEnoA. (A) Ligand blotting with rTsEnoA incubated with plasminogen and developed with a polyclonal anti-Pig antibody (Lane 1). Ligand blotting assay in the presence of 500 mM  $\epsilon$ ACA (Lane 2). Control mixture in the absence of plasminogen (Lane 3). (B) Plasminogen-binding to rTsEnoA using a microtiter plate method. rTsEnoA was adsorbed to the microtiter plate followed by incubation with Pig and then with a polyclonal anti-Pig antibody in the presence of  $\epsilon$ ACA. Crude cysticercus extract (CE) was employed as a positive control. Negative controls included plates without either rTsEnoA or CE, as well as coated only with gelatin (Gel). (C) Plasminogen activation assays in presence of rTsEnoA and tPA. Plasmin activity was determined by measuring 4-nitroaniline production. Letters on top of each bar indicate significantly different at  $P < 0.05$  (Kruskal-Wallis test, nonparametric ANOVA).

#### Acknowledgments

This work was supported by grant from PAPIIT-UNAM IN211217 (RJB). Dolores Adriana Ayón Núñez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 280263 from CONACYT. We also thank Karel Estrada, Cristina Parada Colín, Patricia de la Torre, Beatriz Hernández Téllez, Nelly Villalobos, Omar Rangel-Rivera and Mariana López Filloy for technical support.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.020>.

#### References

- Alvarez, J.I., Rivera, J., Teale, J.M., 2008. Differential release and phagocytosis of t-  
t-ment glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion  
strategies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2 (4), e218.  
Amit, P., Prasad, K.N., Kumar, G.R., Shweta, T., Sanjeev, J., Kumar, P.V., Mukesh, T.,  
2011. Immune response to different fractions of *Taenia solium* cyst fluid antigens in

- patients with neurocysticercosis. *Exp. Parasitol.* 127, 687–692.  
Andrade, Z.A., 1994. Extracellular matrix degradation in parasitic diseases. *Braz. J. Med.  
Biol. Res.* 27 (9), 2273–2281.  
Baig, S., Damian, R.T., Molinari, J.L., Tato, P., Morales-Montor, J., Welch, M., Talhouk, J.,  
Hashmeys, R., White Jr., A.C., 2005. Purification and characterization of a meta-  
cestode cysteine proteinase from *Taenia solium* involved in the breakdown of human  
IgG. *Parasitology* 131, 411–416.  
Barthel, D., Schindler, S., Zipfel, P.F., 2012. Plasminogen is a complement inhibitor. *J.  
Biol. Chem.* 287, 18831–18842.  
Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G.S.,  
Hammerschmidt, S., 2003. Identification of a novel plasmin(in)-binding motif in  
surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 49,  
411–423.  
Bergmann, S., Rohde, M., Preissner, K.T., Hammerschmidt, S., 2005. The nine residue  
plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of  
plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and  
transmigration. *Thromb. Haemost.* 94, 304–311.  
Bernal, D., de la Rubia, J.E., Carrasco-Abad, A.M., Toledo, R., Mas-Coma, S., Marcilla, A.,  
2004. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secre-  
tory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Lett.* 563, 203–206.  
Bhattacharya, S., Ploplis, V.A., Castellino, F.J., 2012. Bacterial plasminogen receptors  
utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination. *J. Biomed.  
Biotechnol.* 2012, 482096.  
Bobes, R.J., Fragoso, G., Fleury, A., García-Varela, M., Sciuotto, E., Larralde, C., Lacleite,  
J.P., 2014. Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of  
taenid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. *Infect. Genet. Evol.* 23,  
150–160.

- Brehm, K., Kozioł, U., 2017. *Echinococcus*-host interactions at cellular and molecular levels. *Adv. Parasitol.* 95, 147–212.
- Chen, N., Yuan, Z.G., Xu, M.J., Zhou, D.H., Zhang, X.X., Zhang, Y.Z., 2012. *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine* 30, 3478–3482.
- Damian, R.T., 1997. Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology* 115, 169–175.
- De la Torre-Escudero, E., Manzano, R.R., Pérez, S.R., Siles, L.M., Oleaga, A., 2010. Cloning and characterization of a plasminogen binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Vet. Parasitol.* 173, 76–84.
- Edwards, Y.H., Grootegoed, J.A., 1983. A sperm-specific enolase. *J. Reprod. Fertil.* 68, 305–310.
- Ehinger, S., Schubert, W.D., Bergmann, S., Hammerschmidt, S., Heinz, D.W., 2004. Plasmin(ogen)-binding a-enolase from *Streptococcus pneumoniae*: crystal structure and evaluation of plasmin(ogen)-binding sites. *J. Mol. Biol.* 343, 997–1005.
- Figueiredo, B.C., Da'dara, A.A., Oliveira, S.C., Skelly, P.J., 2015. *Schistosomes* enhance plasminogen activation: the role of tegumental enolase. *PLoS Pathog.* 11 (12), e1005335.
- Figuera, L., Gómez-Arreaza, A., Avilán, L., 2013. Parasitism in optima forma: exploiting the host fibrinolytic system for invasion. *Acta Trop.* 128, 116–123.
- Fleury, A., Carrillo, M.R., Flisser, A., Sciuotto, E., Corona, T., 2011. Subarachnoid basal neurocysticercosis: a focus on the most severe form of the disease. *Expert Rev. Anti Infect.* 9, 123–133.
- Fleury, A., Sciuotto, E., Larralde, C., 2012. Neurocysticercosis is still prevalent in Mexico. *Salud Públ. Méx.* 6, 632–636.
- Flisser, A., Espinoza, B., Tovar, A., Plancarte, A., Correa, D., 1986. Host-parasite relationship in cysticercosis: immunologic study in different compartments of the host. *Vet. Parasitol.* 20, 95–102.
- Flisser, A., 2013. State of the art of *Taenia solium* as compared to *Taenia asiatica*. *Korean J. Parasitol.* 1, 43–49.
- Floden, A.M., Watt, J.A., Brissette, C.A., 2011. *Borrelia burgdorferi* enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. *PLoS One* 11, e27502.
- García, H.H., Pretzell, E.J., Gilman, R.H., Martínez, S.M., Moulton, L.H., Del Brutto, O.H., Herrera, G., Evans, C.A., Gonzalez, A.E., 2004. A trial of antiparasitic treatment to reduce the rate of seizures due to cerebral cysticercosis. *N. Engl. J. Med.* 350, 249–258.
- Ghosh, A.K., Jacobs-Lorena, M., 2011. Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 85–90.
- Ghosh, A.K., Coppens, I., Gårdsvoll, H., Ploug, M., Jacobs-Lorena, M., 2011. *Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *PNAS* 108, 17153–17158.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., 2012. Excretory/secretory antigens from *Diriofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. *Mol. Biochem. Parasitol.* 181, 134–140.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., 2013. Surface associated antigens of *Diriofilaria immitis* adult worms activate the host fibrinolytic system. *Vet. Parasitol.* 196, 235–240.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., 2015. Can the activation of plasminogen/plasmin system of the host by metabolic products of *Diriofilaria immitis* participate in heartworm disease endarteritis? *Parasites Vectors* 1, 194.
- Grossi, G., Grimaldi, A., Cardone, R.A., Monné, M., Reshkin, S.J., Girardello, R., Greco, M.R., Coviello, E., Laurino, S., Falabella, P., 2016. Extracellular matrix degradation via enolase/plasminogen interaction: evidence for a mechanism conserved in Metazoa. *Biol. Cell* 108, 161–178.
- Harper, J.T., Keeling, P.J., 2004. Lateral gene transfer and the complex distribution of insertions in eukaryotic enolase. *Gene* 340, 227–235.
- Hewitson, J.P., Grainger, J.R., Maizels, R.M., 2009. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 167, 1–11.
- Joldar, A., Fischer, P., Bergmann, S., Büttner, D.W., Hammerschmidt, S., Brattig, N.W., 2003. Molecular cloning of an  $\alpha$ -enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. *Biochim. Biophys. Acta* 1627, 111–120.
- Lähteenmäki, K., Kuusela, P., Korhonen, T.K., 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 531–552.
- Li, W.H., Qu, Z.G., Zhang, N.Z., Yue, L., Jia, W.Z., Luo, J.X., Yina, H., Fu, B.Q., 2015. Molecular characterization of enolase gene from *Taenia multiceps*. *Res. Vet. Sci.* 102, 53–58.
- Lu, C.Y., Lai, S.C., 2013. Matrix metalloproteinase-2 and -9 lead to fibronectin degradation in astroglia infected with *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 125 (3), 320–329.
- Marcilla, A., Pérez-García, A., Espert, A., Bernal, D., Muñoz-Antolí, C., Esteban, J.G., Toledo, R., 2007. *Echinostoma caproni*: identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. *Exp. Parasitol.* 117, 57–64.
- McKerrow, J.H., Keene, W.E., Jeong, K.H., Werb, Z., 1983. Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. I. Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host. *Lab. Invest.* 49 (2), 195–200.
- Mendlovic, F., Cruz-Rivera, M., Ávila, G., Vaughan, G., Flisser, A., 2015. Cytokine, antibody and proliferative cellular responses elicited by *Taenia solium* calreticulin upon experimental infection in hamsters. *PLoS One* 10 (3), e0121321.
- Nakamura, N., Dai, Q., Williams, J., Goulding, E.H., Willis, W.D., Brown, P.R., Eddy, E.M., 2013. Disruption of a spermatogenic cell-specific mouse enolase 4 (eno4) gene causes sperm structural defects and male infertility. *Biol. Reprod.* 88, 1–12.
- Navarrete-Perea, J., Moguel, B., Mendoza-Hernández, G., Frago, G., Sciuotto, E., Bobes, R.J., Lacleste, J.P., 2014. Identification and quantification of host proteins in the vesicular fluid of porcine *Taenia solium* cysticerci. *Exp. Parasitol.* 143, 11–17.
- Navarrete-Perea, J., Toledano-Magaña, Y., De la Torre, P., Sciuotto, E., Bobes, R.J., Soberón, X., Lacleste, J.P., 2016. Role of porcine serum haptoglobin in the host-parasite relationship of *Taenia solium* cysticercosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 207, 61–67.
- Pancholi, V., 2001. Multifunctional  $\alpha$ -enolase: its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 902–920.
- Pearce, J.M., Edwards, Y.H., Harris, H., 1976. Human enolase isozymes: electrophoretic and biochemical evidence for three loci. *Ann. Hum. Genet.* 39, 263–276.
- Piast, M., Kustrzeba-Wójcicka, I., Matusiewicz, M., Banaś, T., 2005. Molecular evolution of enolase. *Acta Biochim. Pol.* 52, 507–513.
- Rojas, M., Labrador, I., Concepción, J.L., Aldana, E., Avilan, L., 2008. Characteristics of plasminogen binding to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Acta Trop.* 107, 4–8.
- Sanderson-Smith, M.L., De Oliveira, D.M., Ranson, M., McArthur, J.D., 2012. Bacterial plasminogen receptors: mediators of a multifaceted relationship. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 272148.
- Santivañez, S.J., Hernández-González, A., Chile, N., Oleaga, A., Arana, Y., Palma, S., Verastegui, M., Gonzalez, A.E., Gilman, R., Garcia, H.H., Siles-Lucas, M., 2010. Cysticercosis working group in Peru: proteomic study of activated *Taenia solium* oncospheres. *Mol. Biochem. Parasitol.* 171, 32–39.
- Schmechel, D., Maragos, P.J., Zis, A.P., Brightman, M., Goodwin, F.K., 1978. Brain enolases as specific markers of neuronal and glial cells. *Science* 199, 313–315.
- Sciuotto, E., Frago, G., Fleury, A., Lacleste, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L., Larralde, C., 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* 2, 1875–1890.
- Sciuotto, E., Chavarría, A., Frago, G., Fleury, A., Larralde, C., 2007. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite Immunol.* 29, 621–636.
- Singh, S., Chitnis, C.E., 2017. Molecular signaling involved in entry and exit of malaria parasites from host erythrocytes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7, 6.
- Singh, B., Fleury, C., Jalalvand, F., Riesbeck, K., 2012. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (6), 1122–1180.
- Singh, A.K., Prasad, K.N., Prasad, A., Tripathi, M., Gupta, R.K., Husain, N., 2013. Immune responses to viable and degenerative metacystodes of *Taenia solium* in naturally infected swine. *Int. J. Parasitol.* 43, 1101–1107.
- Singh, S.K., Singh, A.K., Prasad, K.N., Singh, A., Rai, R.P., Tripathi, M., Gupta, R.K., Husain, N., 2015. Expression of adhesion molecules, chemokines and matrix metalloproteinases (MMPs) in viable and degenerating stage of *Taenia solium* metacystode in swine neurocysticercosis. *Vet. Parasitol.* 214 (1–2), 59–66.
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690.
- Tedford, E., McConkey, G., 2017. Neurophysiological changes induced by chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Pathogens* 6, 19.
- Terrazas, L.L., 2008. The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. *Curr. Top. Med. Chem.* 8, 383–392.
- Thibeaux, R., Avé, P., Bernier, M., Morcelet, M., Frileux, P., Guillén, N., Labruyère, E., 2014. The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. *Nat. Commun.* 7 (5), 5142.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., 1997. The Clustal windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
- Tracy, M.R., Hedges, S.B., 2000. Evolutionary history of the enolase gene family. *Gene* 259, 129–138.
- Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garciarubio, A., Sánchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Frago, G., Sciuotto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H.M., Cai, X., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T.A., Deplazes, P., Estrada, K., Fernández, C., Holland, P.W.H., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S.S., Kamenetzky, L., Keane, J.A., Kiss, F., Kozioł, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J.D., Zamanian, M., Zheng, Y., *Taenia solium* Genome Consortium, Cai, J., Soberón, X., Olson, P.D., Lacleste, J.P., Brehm, K., Berriman, M., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496 (Apr. (4)), 57–63 7443.
- Ueta, H., Nagasawa, H., Oyabu-Manabe, Y., Toida, K., Ishimura, K., Hori, H., 2004. Localization of enolase in synaptic plasma membrane as an alphas gamma heterodimer in rat brain. *Neurosci. Res.* 48, 379–386.
- Vanegas, G., Quiñones, V., Carrasco-López, C., Concepción, J.L., Albericio, F., Avilán, L., 2007. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitol. Res.* 101, 1511–1516.
- Verhamme, I.M., Panizzi, P.R., Bock, P.E., 2015. Pathogen activators of plasminogen. *J. Thromb. Haemost.* 13, S106–S114.
- Victor, B., Kanobana, K., Gabriél, S., Polman, K., Deckers, N., Dorny, P., Deelder, A.M., Palmblad, M., 2012. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacystode excretion-secretion proteins. *Proteomics* 12, 860–869.
- Virginio, V.G., Monteiro, K.M., Drumond, F., De Carvalho, M.O., Vargas, D.M., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2012. Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protozoosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 183, 15–22.
- Wang, X., Chen, W., Hu, F., Deng, C., Zhou, C., Lv, X., Fan, Y., Men, J., Huang, Y., Sun, J., Hu, D., Chen, J., Yang, Y., Liang, C., Zheng, H., Hu, X., Xu, J., Wu, Z., Yu, X., 2011. Clonorchis sinensis enolase: identification and biochemical characterization of a glycolytic enzyme from excretory/secretory products. *Mol. Biochem. Parasitol.* 177, 135–142.
- Willms, K., Arcos, L., 1997. *Taenia solium*: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. *Exp. Parasitol.* 43, 396–406.

- Willms, K., Presas, A.M., Jiménez, J.A., Landa, A., Zurabián, R., Ugarte, M.E., Robert, L., 2005. Taeniid tapeworm responses to in vitro glucose. *Parasitol. Res.* 96, 296–301.
- Xolalpa, W., Vallecillo, A.J., Lara, M., Mendoza-Hernandez, G., Comini, M., Spallek, R., Singh, M., Espitia, C., 2007. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 7, 3332–3341.
- Yang, J., Qiu, C., Xia, Y., Yao, L., Fu, Z., Yuan, C., Feng, X., Lin, J., 2010. Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase: which is highly expressed at the schistosomulum stage. *Parasitol. Res.* 107, 667–677.
- Zhang, S., Guo, A., Zhu, X., You, Y., Hou, J., Wang, Q., Luo, X., Cai, X., 2015. Identification and functional characterization of alpha-enolase from *Taenia pisiformis* metacystode. *Acta Trop.* 144, 31–40.

Review Article

# Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases

Dolores A. Ayón-Núñez, Gladis Fragoso, Raúl J. Bobes and Juan P. Laclette

Department of Immunology, Institute for Biomedical Research, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Correspondence: Juan P. Laclette (laclette@biomedicas.unam.mx) or Raúl J. Bobes (rbobes@biomedicas.unam.mx)



Pathogens have developed particular strategies to infect and invade their hosts. Amongst these strategies' figures the modulation of several components of the innate immune system participating in early host defenses, such as the coagulation and complement cascades, as well as the fibrinolytic system. The components of the coagulation cascade and the fibrinolytic system have been proposed to be interfered during host invasion and tissue migration of bacteria, fungi, protozoa, and more recently, helminths. One of the components that has been proposed to facilitate pathogen migration is plasminogen (Plg), a protein found in the host's plasma, which is activated into plasmin (Plm), a serine protease that degrades fibrin networks and promotes degradation of extracellular matrix (ECM), aiding maintenance of homeostasis. However, pathogens possess Plg-binding proteins that can activate it, therefore taking advantage of the fibrin degradation to facilitate establishment in their hosts. Emergence of Plg-binding proteins appears to have occurred in diverse infectious agents along evolutionary history of host-pathogen relationships. The goal of the present review is to list, summarize, and analyze different examples of Plg-binding proteins used by infectious agents to invade and establish in their hosts. Emphasis was placed on mechanisms used by helminth parasites, particularly taeniid cestodes, where enolase has been identified as a major Plg-binding and activating protein. A new picture is starting to arise about how this glycolytic enzyme could acquire an entirely new role as modulator of the innate immune system in the context of the host-parasite relationship.

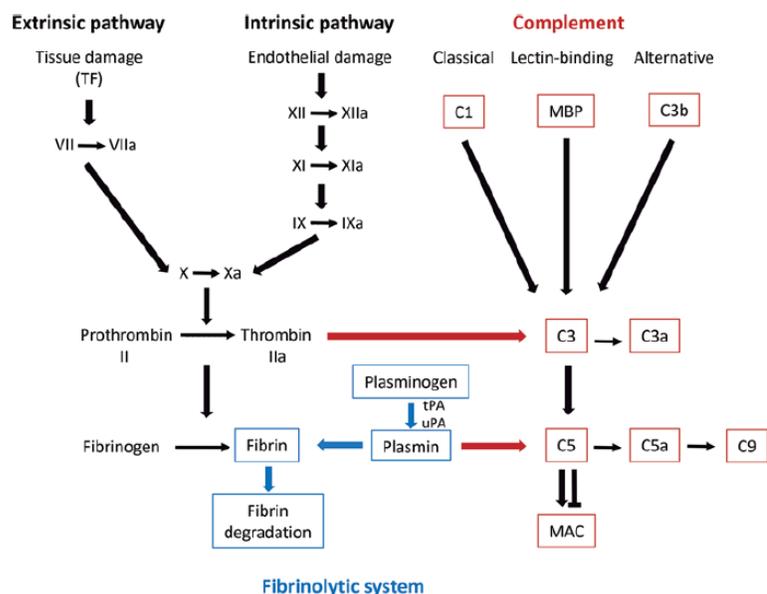
## Introduction

Infectious agents migrate to their predilection sites in the host tissues, sometimes requiring to trespass physical barriers of the host such as epithelia, extracellular matrices (ECM), basement membranes, or circumvent several effector systems along their journey through the bloodstream [1-3]. They evade innate and adaptive host's immune responses, involving the participation of multiple proteins, including proteolytic enzymes, receptors, immunomodulatory molecules, amongst many other factors that facilitate their dissemination and establishment in host's tissues [4-8]. Infectious agents can uptake and use host proteins for their benefit [9-11]. In particular, it has been proposed that they can take advantage of the host's coagulation cascade through the activation of plasminogen (Plg) to be converted into an active proteolytic enzyme (plasmin (Plm)). Plm participates indirectly in the degradation of ECM proteins and cell-junction proteins, thus facilitating invasion and establishment [12,13].

The goal of the present review is to list, summarize, and analyze different examples of Plg-binding proteins used by infectious agents to invade and establish in its host. These appear to be adaptive mechanisms of those infectious agents taking advantage of host's proteins. To facilitate the analysis, the review was divided in bacterial and fungal infectious agents and protozoal and helminth

Received: 07 May 2018  
Revised: 27 July 2018  
Accepted: 14 August 2018

Accepted Manuscript Online:  
30 August 2018  
Version of Record published:  
2 October 2018



**Figure 1. Relationship of coagulation and complement cascades with the fibrinolytic system**  
 The coagulation cascade has two pathways: the intrinsic and the extrinsic. Both pathways merge through factors V and X, resulting in the formation of clots. The fibrinolytic system relates with the final stage of the coagulation cascade, and its primary function is the proteolytic elimination of clots on blood vessels. Complement C5 can be activated by several coagulation enzymes (thrombin, factor IXa, factor Xa, factor XIa, and kallikrein). Plm can also activate complement through C5 degradation.

parasites. A short section also considers tumor cells as invasive agents. Special emphasis was given to the mechanisms that helminth parasites, particularly cestodes, use to migrate and establish into predilection tissues in the host. Understanding these mechanisms might result in strategies for the prevention and control of infectious pathogens.

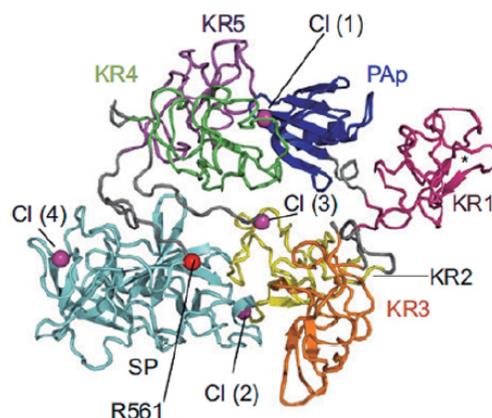
## Coagulation, complement, and fibrinolysis

### The coagulation cascade and the fibrinolytic system

The coagulation cascade is a complex sequence of proteolytic reactions that ends with the formation of the fibrin clot. The coagulation cascade involving cellular (platelets) and proteolytic factors is activated when the endothelium of a blood vessel is damaged. The immediate goal is to stop bleeding, facilitating and promoting other mechanisms for damage control and repair. The coagulation cascade proceeds in two pathways: the intrinsic, formed by factors VIII, IX, XI, XII and the extrinsic, regulated by tissue thromboplastin and factor VII (Figure 1). Both pathways merge through factors V and X, that require calcium and platelet phospholipids, resulting in the formation of fibrin networks known as clots [14,15].

The fibrinolytic system participates in the final stage of the coagulation cascade and its primary function is the elimination of clots deposited in the blood vessels mainly through proteolytic action. The central reaction of the fibrinolytic system is the activation of Plg to Plm [16]. Degradation of clots depends on the binding of Plg/Plm to lysine residues located at the C-terminal end and to some internal lysine residues in fibrin networks (and other receptors); Plg binding requires lysine-binding sites (Figure 1) located in Kringle domains [17].

Plm is a broad-spectrum serine protease that degrades fibrin, ECM, and connective tissue through the participation of other proteolytic enzymes, including metalloproteases and collagenase [3]. A large number of pathogens including parasites express Plg receptors that immobilize Plg on their surface resulting in its activation; it has been proposed that the activation of Plg facilitates migration and invasion of these pathogens to different tissues in the host, as well as evasion mechanisms of the immune response, mostly through activation of the complement cascade [18-23].



**Figure 2.** The structure of human Plg

Domains are labeled and colored as follows: Pap, blue; KR1, pink; KR2, yellow; KR3, orange; KR4, green; KR5, purple; SP, cyan. The chloride ions (Cl) 1 and 2 are in the interface KR4/Pap and KR2/SP, respectively, and are shown as spheres. Two other chloride ions 3 and 4, bind to the KR2 and SP domain, respectively. The position of the activation loop is marked with a red sphere. The LR of KR1 is marked with an asterisk (\*). Figure taken from Law et al. (2012) [38].

## The coagulation cascade and the complement system

The coagulation and complement cascades are closely associated. A number of studies have demonstrated that coagulation and complement share several activators and inhibitors [24-28]. The complement cascade activation occurs by three distinct but interrelated pathways: the classical, the lectin, and the alternative (Figure 1). The classical pathway is initiated by immune complexes, the lectin pathway is initiated through the binding of the mannose-binding protein (MBP) to bacterial surfaces, and the alternative pathway is initiated by bacterial endotoxin present in the outer surface of bacteria and yeasts [29]. All pathways merge at the level of the C3 convertase before resulting in the formation of the membrane attack complex (C5b-9 or MAC) and the release of several active anaphylatoxins, opsonins, and other active molecules. The complement C5 can be activated by several coagulation enzymes including thrombin, factor IXa, factor Xa, factor XIa, and kallikrein (Figure 1). Plm can also activate complement but degrade C5, thereby preventing C5b deposition and MAC formation, which is a powerful lytic agent in bacterial infections. Both cascades contain a sequence of serine-proteases present in the plasma and serve important roles in innate host defense and hemostasis.

## Structure of Plg

Plg is synthesized in the liver as a glycoprotein of 810 amino acids and approximately 90 kDa, also known as Glu-Plg. When secreted into plasma, the signal peptide in the N-terminal end (19 amino acid residues) is lost to become the mature form [30]. Plg can be found in two forms: the Glu-Plg that has a residue of glutamic acid at the N-terminal end and the Lys-Plg having a Lys<sup>77</sup> residue at the N-terminal end [31]. Glu-Plg is converted into Lys-Plg by exogenous Plm that removes a 77 amino-terminal peptide [32]. Lys-Plg is more efficiently activated by fibrinolytic activators than Glu-Plg [33,34]. Both forms of Plg are made up of seven structural domains, an activation peptide in the N-terminal region known as the Pap domain (1-77 aa), five Kringle domains (KR1-5), and an SP serine protease domain (562-791 aa) (Figure 2) [35,36]. The Kringle domains mediate Plg-binding by lysine-binding sites (see above), to substrates and to cell surface receptors. The Pap domain interacts with KR4 and KR5, this interaction is critical to maintain a closed conformation of Plg. However, Plg can also be present in its open conformation (pre-activation), suggesting that a conformational rearrangement exposes the cleavage site for the Plg activators (PAs), whose action will result in the formation of Plm, the active protease [36,37].

## Activators and physiological inhibitors of Plg/Plm

The activation of Plg to Plm is mediated by the proteolytic action of two major types of PAs, the tissue-type (tPA) and the urokinase-type (uPA); both activate Plg by cutting specifically between Arg<sup>560</sup>-Val<sup>561</sup> residues, in the SP domain [38]. However, some bacteria secrete different PAs, such as streptokinase (Streptococci, groups A, C, and G), staphylokinase (*Staphylococcus aureus* lysogenic), Pla (*Yersinia pestis*), PauA (secreted by *Streptococcus uberis*), and PadA (*Streptococcus dysgalactiae*) [39-44]. On the other hand, fibrinolysis is a highly regulated process involved in hemostasis, requiring participation of different inhibitors; best known are  $\alpha$ 2-antiplasmin and  $\alpha$ 2-macroglobulin (Plm inhibitors), PAI-1, PAI-2, and PAI-3 (inhibitors of Plg activators) [45-49].

## Participation of Plg/Plm in other cellular processes

In addition to its interaction with fibrin, Plg/Plm can act on other proteins such as cell surface receptors, coagulation components (factors V, VIII, and X), metalloproteases, as well as structural components of the ECM, including laminin, fibronectin, complement factors (C3 and C5), vitronectin etc. [13,50-54]. Therefore, Plg/Plm have been associated with several physiological and pathological functions in fibrinolysis and hemostasis, degradation of ECM, tumor growth, invasion, migration, tissue remodeling, wound healing, angiogenesis, and evasion of the immune response [13,55,56].

## Role of Plg receptors in sterile and non-sterile conditions

### Plg receptors in cancer

Cellular Plg/Plm receptors are ubiquitous, show high affinity for their ligand, and are usually expressed on cell surfaces [1,57,58]. Neoplastic cells behave in several aspects like infectious agents, indeed, Plg-binding proteins have also been involved as a mechanism to evade the innate response against tumor cells. Degradation of ECM is a crucial step in tumor cell invasion and thus, in metastasis. Plg is one of several proteases that facilitate tumor cell motility by disrupting the basement membrane and stromal barriers [59,60]. The presence of actin, enolase-1, cytokeratin 8, and annexin 2 have been associated with poor prognosis and resistance to chemotherapy of malignant tumors in patients. These proteins are overexpressed in cancer cells and have the ability to bind Plg/Plm, making them good diagnostic and prognostic markers, for example in breast, lung, and pancreas carcinomas [58,61]. The critical role of the Plg/Plm system in cancer biology is supported by *in vitro* and *in vivo* studies;  $\alpha$ -enolase has been identified as a potentially useful candidate for diagnosis and prognosis as well as for therapy using antibodies [55]. *In vitro* treatment of lung and bone cancer cells with antibodies against  $\alpha$ -enolase, as well as with shRNA plasmids, appears to be a promising approach to suppress tumor metastasis, as it inhibits ECM degradation and invasion of cancer cells [13,55]. Moreover, *in vivo* studies of cancer utilizing Plg-deficient mice, demonstrated a markedly reduced angiogenesis and decreased metastatic potential [62-64].

### Plg receptors in bacteria

Recruitment of host proteases on the bacterial surface represents a particularly effective mechanism for increasing invasiveness [65]. One of the protease systems involved is the Plg/Plm; for which over 40 binding proteins have been reported in bacterial species (Table 1) [57]. These proteins include metabolic enzymes, components of signaling pathways, structural proteins, amongst others. In *Mycobacterium tuberculosis* 13 proteins have been reported, 11 in *Borrelia burgdorferi*, and 13 in *Leptospira interrogans*, to mention a few examples. Several models have been proposed in bacterial infections to explain the involvement of these proteins during invasion [2,57]. The degradation of ECM proteins in different bacteria was also evaluated, for example: in *Leptospira*, bound Plg is converted into Plm by uPA, for degradation of fibronectin and laminin, as evaluated by ELISA [66]. Also, *Leptospira* enolase-bound Plg has been described to degrade vitronectin [12]. Several examples of Plg receptors have also been described for *Mycoplasma* species [67,68].

Plg/Plm regulates both, coagulation and complement cascades in bacterial infections; interaction with the complement system may help bacteria to evade host's immune system, facilitating invasion. Plm cleaves human complement proteins C3b and C5 in the presence of *L. interrogans* proteins: LigA and LigB [69]. Moreover, Lsa23 can block activation of both, alternative and classical pathways of complement. PLG bound to Lsa23 could be converted into Plm, which in turn degrades C3b and C4b [70]. These results suggest that Lsa23 might be involved in complement evasion processes by acting on three different mechanisms and could assist *Leptospira* to overcome lysis promoted by the MAC.

**Table 1** Plg-binding proteins in pathogenic bacteria

Plg-binding proteins	Bacterial species	References
Type 1 fimbriae	<i>Escherichia coli</i>	[71]
OspA	<i>Borrelia burgdorferi</i>	[72]
BBA70		[73]
OspC		[74]
CRASP-1, 3, 4, and 5		[75]
ErpP, ErpA, and ErpC		[76]
Erp63	<i>Borrelia spielmanii</i>	[77]
DnaK, GroES, GlnA1, Ag85 complex, Mpt51, Mpt64, PrcB, MetK, SahH, Lpd, Icl, Fba, and EF-Tu	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[78,79]
LenA	<i>Leptospira interrogans</i>	[80]
Leptospiral surface adhesion, Lsa66 and Lp30		[81]
LIC12238, LIC10494, LIC12730, LipL32, LipL40, Lp29, Lp49, Lsa20 and Lsa6		[82]
EF-Tu		[83]
Lsa44 and Lsa45		[84]
GAPDH	Group A streptococci	[85]
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	[86,87]
	<i>Bacillus anthracis</i>	[88]
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	[89]
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	[90]
	<i>Clostridium perfringens</i>	[91]
	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	[92]
	<i>Riemerella anatipestifer</i>	[93]
	<i>Escherichia coli</i>	[94]
Enolase	<i>Neisseria meningitidis</i>	[95]
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	[96]
	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	[67]
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	[97]
	<i>Candida albicans</i>	[98]
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	[89]
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	[99]
	<i>Leptospira interrogans</i>	[12]
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[100]
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	[101]
Triosephosphate isomerase	<i>Staphylococcus aureus</i>	[102]
Phosphoglycerate kinase	Group B <i>Streptococcus</i>	[103]
Fructose 1,6-bisphosphate aldolase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[78,79]
	<i>Neisseria meningitidis</i>	[104]
DNaK and Peroxiredoxin	<i>Neisseria meningitidis</i>	[105]
PdhA-C, GAPDH-A, Ldh, Pgm, Pyk, and Tkt	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	[68]
Skizze	<i>Streptococcus agalactiae</i>	[106]

Abbreviations: Antigen 85, mycolyltransferase, Fn binding protein, Ag85A, Ag85B, and Ag85C; DnaK, heat shock protein 70 or protein chaperone DnaK; EF-Tu, iron-regulated elongation factor TU; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GlnA1, glutamine synthetase A1; GroES, 10-kDa chaperonin; CRASP, surface protein that acquires the complement regulator; Icl, isocitrate lyase; Ldh, lactate dehydrogenase; LHP, dihydroliipoamide dehydrogenase; MetK, methionine adenosyltransferase; Mpt51, related Ag85 complex protein, with mycooil transferase, Fn binding protein D; Mpt64, immunogenic protein; OspA, outer surface protein A; OspC, outer surface protein C; PdhA-C, pyruvate dehydrogenases A to C; Pgm, phosphoglycerate mutase; PrcB, proteasome  $\beta$  subunit; Pyk, pyruvate kinase; Tkt, transketolase.

## Plg receptors in fungi

Several fungal pathogenic species express molecules that interact with host proteins during pathogen invasion, colonization, and growth. The ability to interact with host components, including blood, ECM proteins, and human complement regulators, appears to be essential for pathogen survival. Fungal parasite species express Plg-binding proteins (Table 2). *Candida* species have been reported to exhibit numerous Plg-binding proteins: eight proteins have

**Table 2** Plg-binding proteins in pathogenic fungi

Plg-binding proteins	Fungi species	References
Pgm, alcohol dehydrogenase, thioredoxin peroxidase, catalase, transcription elongation factor, GAPDH, phosphoglycerate kinase, and fructose biphosphate aldolase	<i>Candida albicans</i>	[107]
Pra1		[114]
Pgm		[115]
CPAR2_404780, CPAR2_404800, Ssa2, and 6-phosphogluconate dehydrogenase 1	<i>Candida parapsilosis</i>	[108]
Fructose 1,6-bisphosphate aldolase	<i>Paracoccidioides</i> sp.	[116]
Enolase	<i>Aspergillus nidulans</i> and <i>Candida albicans</i>	[110]
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	[111,112]
	<i>Pneumocystis carinii</i>	[113]
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, heparinase	<i>Trichosporon asahii</i>	[117]
Triosephosphate isomerase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	[118]
Not identified		[119]
Hsp70, Cpn60, glucose-6-phosphate isomerase, ATP synthase subunit $\beta$ , Pyk, ATP synthase subunit $\alpha$ , response to stress-related protein, phosphoglycerate kinase, putative uncharacterized protein, ATP synthase $\gamma$ chain, ATP synthase $\delta$ chain, Putative uncharacterized protein, ketol-acid reductoisomerase, Transaldolase, inorganic diphosphatase, dihydrolypoyl dehydrogenase, fructose-bisphosphate aldolase, glutamate dehydrogenase, enolase		[109]

Abbreviations: Cpn60, heat shock protein 60; Hsp70, heat shock protein 70; Pgm, phosphoglycerate mutase; Pyk, pyruvate kinase.

been reported in *Candida albicans*: phosphoglycerate mutase, alcohol dehydrogenase, thioredoxin peroxidase, catalase, the transcription elongation factor, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), phosphoglycerate kinase, and fructose bisphosphate aldolase [107]; four proteins have been reported in *C. parapsilosis*: CPAR2\_404780, CPAR2\_404800, Ssa2, and 6-phosphogluconate dehydrogenase 1 [108]. In the case of *Cryptococcus neoformans*, 18 proteins have been identified as capable of binding host's Plg system to allow the fungus to cross tissue barriers, supporting the hypothesis that Plg binding may contribute to trespass the blood-brain barrier [109]. The role of enolase in pathogenicity has also been studied in fungal parasites including *Aspergillus nidulans*, *C. albicans* [110], *Paracoccidioides brasiliensis* [111,112], and *Pneumocystis carinii* [113]. However, only the role of enolase in the processes of invasion and dissemination of fungal infections has been hypothesized, since no functional studies have been done yet.

### Plg receptors in protozoan parasites

The role of Plg for intracellular parasites has been less documented (Table 3). However, involvement of Plg in invasiveness and pathogenesis of some parasites has been clearly shown. For example, it has been reported that binding of Plg/Plm contributes to virulence in *Leishmania mexicana*. Furthermore, Plg binding has been shown to be highly heterogeneous amongst different morpho-phenotypes of promastigotes, including a Plg-binding increase related to the differentiation of the promastigotes [120]. The course of the infection was also evaluated in a Plg-deficient mice, demonstrating that Plg has an effect on the distribution pattern of these parasites in the lesion produced by *L. mexicana*, but does not have an effect on the dissemination of the parasite to other organs [121]. *L. mexicana* enolase has been described to interact with Plg on the surface of the parasite through an internal motif: <sup>249</sup>AYDAERKMY<sup>257</sup> [122,123]. An activated C-kinase (LACK, *Leishmania* homolog of receptors for activated C-kinase) also binds Plg; this is a homologous receptor of *Leishmania* sp. that binds and activates Plg in the presence of tPA through an internal motif similar to that in enolase (<sup>260</sup>VYDLESKAV<sup>268</sup>); this being a new function of the protein that could contribute to the invasiveness of the parasite [124].

**Table 3** Plg-binding proteins in protozoan parasites

Proteins	Parasite species	Binding characteristics	References
Enolase	<i>Leishmania mexicana</i>	- Heterogeneous binding between the morpho-phenotypes of promastigotes - Enolase binds through an internal motif (249 AYDAERKMY <sup>257</sup> )	[120,122]
LACK		LACK binds through an internal motif similar to that of enolase (280 VYDLESKAV <sup>288</sup> )	[124]
Enolase	<i>Plasmodium yoelii</i>	The oocysts bind the Plg	[125]
Enolase	<i>Plasmodium falciparum</i> <i>Plasmodium berghei</i>	The enolase of the oocysts binds Plg through an internal motif (DKSLVK)	[126]
Not identified	<i>Trypanosoma cruzi</i>	The trypomastigote and epimastigote bind Plg on its surface	[127,128]
Not identified	<i>Trypanosoma evansi</i>	The Plg have greater bonding capacity compared with others from the same family	[129]
GAPDH	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Natural GAPDH and the recombinant bound to immobilized Plg, FN, and collagen	[130]

On the other hand, *Trypanosoma cruzi* during its life cycle alternates between different morphological types: epimastigote, metacyclic trypomastigote in the insect vector, amastigote, and the blood trypomastigote in the mammalian host. The trypomastigote and the epimastigote thrive outside a host cell, which means that they interact directly with host fluids; both show the ability to interact with Plg [127]. This has also been demonstrated and quantitated in epimastigotes [129]. However, *T. evansi* possess receptors with higher Plg-binding affinity, unlike *T. cruzi* and other parasites of this family [121].

In the *Plasmodium* species, the oocysts play an important role in the host's invasion. The oocysts have to trespass two physical barriers in the insect host: the peritrophic matrix and the midgut epithelium [126]. Enolase in *Plasmodium yoelii* is associated with nuclear elements, cell membrane, and cytoskeleton, suggesting that it may play non-glycolytic functions such as participating in the host invasion through Plg binding [125]. It was recently reported that the superficial enolase of the *P. berghei* and *P. falciparum* oocysts appear to facilitate attachment of the oocysts to the midgut epithelium in the insect, as well as of recruiting Plg through binding to an internal enolase motif (DKSLVK); this interaction is essential for the invasion of the parasite (activated Plg) and for the formation of oocysts [126]. In addition, other components of the fibrinolytic system have been involved in the infection of *P. falciparum*, such as uPA, which binds on the surface of malaria-infected erythrocytes and could be involved in the merozoite release process [131]. The uPA has also been involved in *Toxoplasma gondii* infection through a specific receptor (uPAR: uPA receptor), which could be implicated in macrophage rolling and infection through the expression and secretion of MMP-9 metalloproteinase complexes [132].

### Plg receptors in helminth parasites

The study of Plg-binding proteins in helminth parasites has been addressed in recent years (Table 4). Most of the studied parasite diseases have a life stage in the circulatory system, in contact with proteins of the fibrinolytic system of the host. Parasites have developed different strategies to evade the immune response of the host; one of them appears to be the recruitment of Plg on the worm's surface. Plg-binding has been studied in *Dirofilaria immitis*; an E/S antigen extract of adult worms allowed identification of ten Plg-binding proteins: HSP60, actin-1/3, actin, actin 4, transglutaminase, GAPDH, Ov87, LOAG 14743, galectin, and P22U [7]. Moreover, an extract of surface proteins from adult worms of *D. immitis* identified eleven proteins, including only two of the abovementioned group: actin-5C, actin-1, enolase, fructose-bisphosphate aldolase, GAPDH, MSP protein domain, MSP 2,  $\beta$ -binding lectin-galactosidase, galectin, protein containing the immunoglobulin I-set domain, and cyclophilin Ovcyp-2. It has been suggested that they interact with the host's fibrinolytic system during invasion [8]. GAPDH and galectin (rDiGAPDH and rDiGAL) recombinants of *D. immitis* were analyzed as Plg-binding proteins. Results indicated that rDiGAPDH and rDiGAL are able to bind Plg and stimulate the generation of Plm by tPA; this interaction requires participation of lysine residues. They also increased the expression of uPA in canine endothelial cells in culture, which suggests that they promote a favorable habitat free of clots in the intravascular environment of the parasite [133].

**Table 4** Plg-binding proteins in helminth parasites

Proteins	Parasite species	Binding characteristics	References
Enolase	<i>Onchocerca volvulus</i>	Ov-ENO binds Plg	[134]
GAPDH		Ov-GAPDH	[135]
GAPDH	<i>Clonorchis sinensis</i>	rCsGAPDH and rCsANXB30 were able to interact with human Plg in a dose-dependent manner. The interaction could be inhibited by lysine	[136]
Annexin B30			[137]
Enolase	<i>Fasciola hepatica</i>	Present in the E/S products	[138]
HSP60, actin-1/3, actin, actin 4, transglutaminase, GAPDH, Ov87, LOAG 14743, Galectina and P22U	<i>Dirofilaria immitis</i>	In an extract of excretion/secretion antigens of adult worm of <i>D. immitis</i>	[7]
Actin-5C, actin-1, enolase, Fba, GAPDH, protein domain MSP, MSP 2, $\beta$ -galactosidase binding lectin, Galectina, and cyclophilin Ovcyp-2		In a surface protein extract of adult worms	[8]
Enolase, Actin, GAPDH, ATP: guanidine kinase, Fba, Pgm, Triosephosphate isomerase, adenylate kinase	<i>Schistosoma bovis</i>	In a total extract of worm proteins	[139]
Enolase	<i>Echinostoma caproni</i>	Present in the E/S products	[20]
Enolase	<i>Taenia multiceps</i>	TmEno is a Plg receptor	[140]
Enolase	<i>Taenia pisiformis</i>	rTpEno could bind to Plg and could be converted into active Plm using host-derived activators. Its binding ability was inhibited by $\epsilon$ ACA	[22]
Enolase	<i>Taenia solium</i>	Plg-binding proteins of cysticerci; TsEnoA is a Plg receptor	[141,142]
Fascicilin-1, Fasciclin-2, MAPK, Annexin, Actin, and cMDH			[142]

Abbreviations: cMDH, cytosolic malate dehydrogenase; Fba, fructose-bisphosphate aldolase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; Pgm, phosphoglycerate mutase;  $\epsilon$ ACA,  $\epsilon$ -aminocaproic acid.

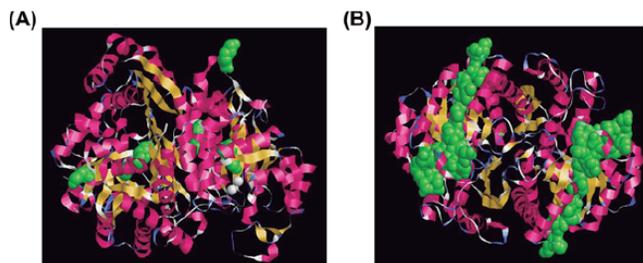
On the other hand, in a total protein extract of *Schistosoma bovis* adult worms, ten Plg-binding proteins were identified: enolase, actin, GAPDH, ATP: guanidine kinase, fructose bisphosphate aldolase, phosphoglycerate mutase, triosephosphate isomerase, adenylate kinase and two hypothetical proteins of *S. japonicum* [139]. Recombinant annexin and enolase possess the ability to bind and activate Plg, suggesting that they play a role in the maintenance of hemostasis within the blood vessels [21,143]. In the case of cestodes, seven Plg-binding proteins were identified in *Taenia solium* cysticerci: fascicilin-1, fasciclin-2, enolase, mitogen-activated protein kinase (MAPK), annexin, actin, and cytosolic malate dehydrogenase [142]. Recombinant enolase was characterized and showed a strong Plg-binding and activating activity *in vitro*, suggesting that enolase could play a role in parasite invasion [141,142].

Other examples of helminth infections where parasite proteins have been involved in Plg/Plm binding as an evasion mechanism of the host's innate defensive response are *Clonorchis sinensis*, in which GAPDH [136] and annexin B30 have been reported as Plg-binding proteins [137]. Enolases have also been reported as Plg-binding proteins in *Onchocerca volvulus* [134], *Fasciola hepatica* [138], *Taenia multiceps* [140], and *T. pisiformis* [22].

## Plg-enolase interaction

Enolase is perhaps the most studied Plg-binding protein in different organisms. Enolase has been identified as an octamer on the surface of group A streptococci; molecular docking analysis have revealed the fine detail of the Plg-enolase binding. Interaction with KR1 and KR5 domains of Plg occurs through lysine residues located at the C-terminal end of enolase, as well as on another internal binding site. Plg undergoes a conformational change to expose the cut site for PAs in order to induce Plm formation [144].

Molecular docking studies have not been carried out for Plg-enolase in parasites; putative Plg-binding sites have been proposed by their similarity with described bacterial binding sites. *T. solium* enolase (TsEnoA) has been shown to bind Plg [142]; apparently, the internal site of Plg is involved but not the lysine residues at the C-terminal end. This idea is supported by results of assays using  $\epsilon$ -aminocaproic acid ( $\epsilon$ ACA), a synthetic inhibitor of the Plm-Plg system which binds to accessible lysine residues. In order to find out the spatial distribution of Plg-binding sites on TsEnoA, we used the amino acid sequence to predict the protein structure using Swiss-Model and RasMol programs. The lysine residues at the C-terminal end were not exposed (Figure 3A), in contrast with the internal site that appears entirely accessible (Figure 3B).



**Figure 3.** Molecular modeling of *T. solium* enolase A (TsEnoA) showing Plg binding sites  
(A) Identification of the C-terminal lysine residues are shown in green; (B) identification of the internal Plg-binding motif of *T. solium* enolase (also shown in green). The modeling was done in: <http://www.openrasmol.org/>.

## Modulation of Plg/Plm function by enolase as a mechanism against host's innate responses in taeniid parasites

Parasites have developed an intimate molecular relationship with their hosts through evolution, thus requiring a number of host proteins for survival, for example to complement their metabolism [10,133]. It is also well known that although parasites have a vast repertoire of proteases [145,146], they also appear to take advantage of host's proteases. We have localized TsEnoA binding of Plg/Plm on the surface of *T. solium* cysticerci [141,142]. As Plm has been involved in the degradation of fibrin clots and ECM, we proposed that binding and activation of Plg might help the parasite to colonize host tissues. Recruitment and activation of Plg has been proposed as a mechanism involved in survival or establishment for other helminths [7,8,139].

Human and porcine cysticercosis is acquired by ingestion of *T. solium* eggs. Poor hygiene conditions and domestic management of human feces and especially, cohabitation with an adult-worm carrier are factors that facilitate transmission of the disease. Eggs contain hexacanth embryos surrounded by an impermeable and highly resistant envelope called embryophore, which allows survival under adverse environmental conditions. Once in the host's gut, proteolytic enzymes and bile salts trigger the release and activation of the hexacanth embryo (also known as oncosphere). Activated embryos trespass the host intestinal wall and reach lymphatic and blood capillaries, through which they are distributed to a wide variety of predilection organs and tissues (subcutaneous tissue, skeletal and cardiac muscle, brain, eyes etc.) [147]. Although events occurring after embryos trespassing the intestinal wall remain mostly unexplored, it is known that few weeks are required for an oncosphere to transform into a metacestode known as cysticercus. The mechanisms by which the parasite reaches a predilection tissue, like the central nervous system, where cysticercus causes neurocysticercosis, are also unknown.

Taeniids possess adhesion molecules and metalloproteases able to degrade ECM [148]. Two previous reports have shown that enolase from *T. multiceps* and *T. psiformis* bind and activate Plg [22,140]. Enolase of *T. solium* was also found to be Plg-binding and activating protein [141,142]. Therefore, it appears that binding and activation of Plg might help early larval forms colonize host tissues, as Plm could aid degradation of fibrin clots and ECM. An interesting experiment would be to test treatment of *T. crassiceps* cysticerci embedded in Matrigel, using antibodies against  $\alpha$ -enolase or shRNA plasmids to find out if cysticerci degrade ECM, following a similar strategy to that currently being tested against cancer treatment [13,55]. Thus, the role of parasite proteins that can bind and activate Plg, along with the extensive expression of proteases such as a chymotrypsin-like peptidase, trypsin-like and cathepsin B-like peptidases [149], could be more related to the capacity of parasites to enter through the intestinal mucosa and invade host tissues. We can speculate that Plm can exert an initial role during parasite invasion to host tissues; once established, it is possible that Plm and other proteases could participate in ECM degradation, allowing parasite establishment, growth, and development, as it has been reported for bacteria, protozoan, and helminth parasites. Moreover, no proteases capable of degrading fibrin clots have been found in parasites. *T. solium* being the only taeniid reaching the CNS, shows the expression of adhesion molecules specific for brain ligands that might be the main factors involved in this tissue-specific parasite invasion.

*T. solium* and other taeniids possess at least four enolase genes [142]. Except for TsEno4, tapeworm enolase amino acid sequences are not orthologs of vertebrate isoforms; thus, the origin of enolase isoforms in vertebrates and invertebrates is not monophyletic. TsEnoA has been characterized and expressed in bacteria showing a strong Plg-binding

and activating activity *in vitro*. TsEno4 is considerably smaller: 28 compared with 46–49 kDa of the other three *T. solium* enolases. Preliminary results have shown that TsEno4 lacks enolase activity as well as Plg-binding activity (Ayón-Núñez et al., unpublished). As TsEno4 is the ancestral enolase in cestodes, the fact that it lacks enolase activity suggests that other isoforms fulfilled the need for a glycolytic enzyme function; TsEno4 lost its enzyme activity and perhaps is now involved in other moonlighting functions that are relevant for the parasite. Our current efforts are directed to explore this possibility. Regardless of the TsEno4 case, as Plg has also been implicated as a modulator of fibrinolysis, complement or even the immune response involved in the survival of a number of pathogens, a tantalizing question would be if this is also an adaptive mechanisms in taeniid parasites.

## Conclusion

Plg/Plm seems to play a relevant role in several examples of infectious agent relationships, including bacteria as well as protozoan, helminth, and perhaps taeniid parasites; possibly involved in the invasion and migration of the parasites through the tissues of the host. Understanding the interactions of different Plg-binding proteins in parasites will allow realizing a new mechanism of invasion, migration, and/or establishment that has not been addressed.

## Author contribution

D.A.A.-N., G.F., R.J.B. and J.P.L. participated intellectually, practically and approved this manuscript for publication through a one semester special course. D.A.A.-N., R.J.B. and J.P.L. edited the paper.

## Competing interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

## Funding

This work was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [grant number 61334]; the PAPIIT-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) [grant numbers IN 213711, IG200616 (to J.P.L.), IN211217 (to R.J.B.)]; D.A.A.N. is a doctoral student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas with fellowship No. 280263 from CONACYT.

## Abbreviations

ECM, extracellular matrix; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MAC, membrane attack complex; PA, plasminogen activator; Plg, plasminogen; Plm, plasmin; tPA, tissue-type PA; uPA, urokinase-type PA.

## References

- Figuera, L., Gómez-Arreaza, A. and Avilán, L. (2013) Parasitism in optima forma: Exploiting the host fibrinolytic system for invasion. *Acta Trop.* **128**, 116–123, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.023>
- Raymond, B.B. and Djordjevic, S. (2015) Exploitation of plasmin(ogen) by bacterial pathogens of veterinary significance. *Vet. Microbiol.* **178**, 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.04.008>
- González-Miguel, J., Siles-Lucas, M., Kartashev, V., Morchón, R. and Simón, F. (2016) Plasmin in parasitic chronic infections: friend or foe? *Trends Parasitol.* **32**, 325–335, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.012>
- Hansell, E., Braschi, S., Medzihradsky, K.F., Sajid, M., Debnath, M., Ingram, J. et al. (2008) Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **16**, e262, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000262>
- Harnett, W. (2014) Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Mol. Biochem. Parasitol.* **195**, 130–136, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.03.007>
- Yang, Y., Wen, Y.J., Cai, Y.N., Vallée, I., Boireau, P., Liu, M.Y. et al. (2015) Serine proteases of parasitic helminths. *Korean J. Parasitol.* **53**, 1–11, <https://doi.org/10.3347/kjp.2015.53.1.1>
- González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. and Simón, F. (2012) Excretory/secretory antigens from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. *Mol. Biochem. Parasitol.* **181**, 134–140, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.10.010>
- González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. and Simón, F. (2013) Surface associated antigens of *Dirofilaria immitis* adult worms activate the host fibrinolytic system. *Vet. Parasitol.* **196**, 235–240, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.028>
- Counihan, N., Chisholm, S.A., Bullen, H.E., Srivastava, A., Sanders, P.R., Jonsdottir, T.K. et al. (2017) *Plasmodium falciparum* parasites deploy Rhop2 into the host erythrocyte to obtain nutrients, grow and replicate. *Elife* **6**, e23217, <https://doi.org/10.7554/eLife.23217>
- Navarrete-Perea, J., Toledano-Magaña, Y., De la Torre, P., Sciuotto, E., Bobes, R.J., Soberón, X. et al. (2016) Role of porcine serum haptoglobin in the host-parasite relationship of *Taenia solium* cysticercosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **207**, 61–67, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.05.010>
- Aldridge, J.R., Jennette, M.A. and Kuhn, R.E. (2006) Uptake and secretion of host proteins by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J. Parasitol.* **92**, 1101–1102, <https://doi.org/10.1645/GE-835R.1>

- 12 Salazar, N., Souza, M.C., Biasioli, A.G., Silva, L.B. and Barbosa, A.S. (2017) The multifaceted roles of *Leptospira* enolase. *Res. Microbiol.* **168**, 157–164, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.005>
- 13 Hsiao, K.C., Shih, N.Y., Fang, H.L., Huang, T.S., Kuo, C.C., Chu, P.Y. et al. (2013) Surface  $\alpha$ -enolase promotes extracellular matrix degradation and tumor metastasis and represents a new therapeutic target. *PLoS ONE* **19**, e69354, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069354>
- 14 Hoffman, M. (2003) Remodeling the blood coagulation cascade. *J. Thromb. Thrombolysis* **16**, 17–20, <https://doi.org/10.1023/B:THRO.0000014588.95061.28>
- 15 Chapin, J.C. and Hajjar, K.A. (2015) Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* **29**, 17–24, <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003>
- 16 Collen, D., Van Hoef, B., Schlott, B., Hartmann, M., Guhrs, K.H. and Lijnen, H.R. (1993) Mechanisms of activation of mammalian plasma fibrinolytic systems with streptokinase and with recombinant staphylokinase. *Eur. J. Biochem.* **216**, 307–314, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18147.x>
- 17 Marti, D.N., Hu, C.K., An, S.S., von Haller, P., Schaller, J. and Llinás, M. (1997) Ligand preferences of kringle 2 and homologous domains of human plasminogen: canvassing weak, intermediate, and high-affinity binding sites by 1H-NMR. *Biochemistry* **30**, 11591–11604, <https://doi.org/10.1021/bi971316v>
- 18 Pancholi, V. and Chhatwal, G.S. (2003) Housekeeping enzymes as virulent factors for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 391–401, <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00283>
- 19 Xolalpa, W., Vallecillo, A.J., Lara, M., Mendoza-Hernandez, G., Comini, M., Spallek, R. et al. (2007) Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* **7**, 3332–3341, <https://doi.org/10.1002/pmic.200600876>
- 20 Marcilla, A., Pérez-García, A., Espert, A., Bernal, D., Muñoz-Antolí, C., Esteban, J.G. et al. (2007) *Echinostoma caproni*: identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. *Exp. Parasitol.* **117**, 57–64, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.03.011>
- 21 De la Torre-Escudero, E., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R., Siles-Lucas, M. and Oleaga, A. (2010) Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Vet. Parasitol.* **173**, 76–84, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.011>
- 22 Zhang, S., Guo, A., Zhu, X., You, Y., Hou, J., Wang, Q. et al. (2015) Identification and functional characterization of alpha-enolase from *Taenia pisiformis* metacystode. *Acta Trop.* **144**, 31–40, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.01.007>
- 23 Siqueira, G.H., Atzingen, M.V., de Souza, G.O., Vasconcellos, S.A. and Nascimento, A.L. (2016) *Leptospira interrogans* Lsa23 protein recruits plasminogen, factor H and C4BP from normal human serum and mediates C3b and C4b degradation. *Microbiology* **162**, 295–308, <https://doi.org/10.1099/mic.0.000217>
- 24 Huber-Lang, M., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., Rittirsch, D., Neff, T.A., McGuire, S.R. et al. (2006) Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat. Med.* **12**, 682–687, <https://doi.org/10.1038/nm1419>
- 25 Krarup, A., Wallis, R., Presanis, J.S., Gál, P. and Sim, R.B. (2007) Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PLoS ONE* **18**, e623, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000623>
- 26 Amara, U., Flierl, M.A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B. et al. (2010) Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J. Immunol.* **185**, 5628–5636, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903678>
- 27 Gulla, K.C., Gupta, K., Krarup, A., Gal, P., Schwaeble, W.J., Sim, R.B. et al. (2010) Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. *Immunology* **129**, 482–495, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03200.x>
- 28 Kanse, S.M., Declerck, P.J., Ruf, W., Broze, G. and Etscheid, M. (2012) Factor VII-activating protease promotes the proteolysis and inhibition of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 427–433, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.238394>
- 29 Amara, U., Rittirsch, D., Flierl, M., Bruckner, U., Klos, A., Gebhard, F. et al. (2008) Interaction between the coagulation and complement system. *Adv. Exp. Med. Biol.* **632**, 71–79
- 30 Castellino, F.J. and Powell, J.R. (1981) Human plasminogen. *Methods Enzymol.* **80**, 365–378, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)80031-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)80031-6)
- 31 Forsgren, M., Råden, B., Israelsson, M., Larsson, K. and Hedén, L.O. (1987) Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *FEBS Lett.* **213**, 254–260, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81501-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81501-6)
- 32 Horrevoets, A.J., Smilde, A.E., Fredenburgh, J.C., Pannekoek, H. and Nesheim, M.E. (1995) The activation-resistant conformation of recombinant human plasminogen is stabilized by basic residues in the amino-terminal hinge region. *J. Biol. Chem.* **270**, 15770–15776, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.26.15770>
- 33 Zhang, L., Gong, Y., Grella, D.K., Castellino, F.J. and Miles, L.A. (2003) Endogenous plasmin converts Glu-plasminogen to Lys-plasminogen on the monocytoid cell surface. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 1264–1270, <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00155.x>
- 34 Markus, G., Evers, J.L. and Hobika, G.H. (1978) Comparison of some properties of native (Glu) and modified (Lys) human plasminogen. *J. Biol. Chem.* **253**, 733–739
- 35 Novokhatny, V.V., Kudinov, S.A. and Privalov, P.L. (1984) Domains in human plasminogen. *J. Mol. Biol.* **179**, 215–232, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90466-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90466-2)
- 36 Law, R.H., Caradoc-Davies, T., Cowieson, N., Horvath, A.J., Quek, A.J., Encarnacao, J.A. et al. (2012) The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep.* **1**, 185–190, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.02.012>
- 37 Ponting, C.P., Marshall, J.M. and Cederholm-Williams, S.A. (1992) Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **3**, 605–614, <https://doi.org/10.1097/00001721-199210000-00012>
- 38 Rijken, D.C. and Lijnen, H.R. (2009) New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 4–13, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x>

- 39 Lähteenmäki, K., Kuusela, P. and Korhonen, T.K. (2001) Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 531–552, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00590.x>
- 40 Collen, D., Van Hoef, B., Schlott, B., Hartmann, M., Guhrs, K.H. and Lijnen, H.R. (1993) Mechanisms of activation of mammalian plasma fibrinolytic systems with streptokinase and with recombinant staphylokinase. *Eur. J. Biochem.* **216**, 307–314, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18147.x>
- 41 Wang, X., Lin, X., Loy, J., Tang, J. and Zhang, X. (1998) Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* **281**, 1662–1665, <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1662>
- 42 Dentovskaya, S.V., Platonov, M.E., Svetoch, T.E., Kopylov, P.K., Kombarova, T.I., Ivanov, S.A. et al. (2016) Two isoforms of *Yersinia pestis* plasminogen activator Pla: intraspecies distribution, intrinsic disorder propensity, and contribution to virulence. *PLoS ONE* **11**, e0168089, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168089>
- 43 Rosey, E.L., Lincoln, R.A., Ward, P.N., Yancey, R.J. and Leigh, J.A. (1999) PauA: a novel plasminogen activator from *streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**, 353
- 44 Singh, S., Bhando, T. and Dikshit, K.L. (2014) Fibrin-targeted plasminogen activation by plasminogen activator, PadA, from *Streptococcus dysgalactiae*. *Protein Sci.* **23**, 714–722, <https://doi.org/10.1002/pro.2455>
- 45 Kruihof, E.K. (1988) Plasminogen activator inhibitors. *Enzyme* **40**, 113–121, <https://doi.org/10.1159/000469153>
- 46 Rijken, D.C. (1995) Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin. Haematol.* **8**, 291–312, [https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(05\)80269-0](https://doi.org/10.1016/S0950-3536(05)80269-0)
- 47 Pawse, A.R. and Tarachand, U. (1997) Clot lysis: role of plasminogen activator inhibitors in haemostasis and therapy. *Indian J. Exp. Biol.* **35**, 545–552
- 48 Nicholl, S.M., Roztocil, E. and Davies, M.G. (2006) Plasminogen activator system and vascular disease. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **4**, 101–116, <https://doi.org/10.2174/157016106776359880>
- 49 Rijken, D.C. and Lijnen, H.R. (2009) New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 4–13, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x>
- 50 Kost, C., Benner, K., Stockmann, A., Linder, D. and Preissner, K.T. (1996) Limited plasmin proteolysis of vitronectin. Characterization of the adhesion protein as morphoregulatory and angiostatin-binding factor. *Eur. J. Biochem.* **236**, 682–688, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0682d.x>
- 51 Prydzial, E.L. et al. (1999) Plasmin converts factor X from coagulation zymogen to fibrinolysis cofactor. *J. Biol. Chem.* **274**, 8500–8505, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8500>
- 52 Cesarman-Maus, G. and Hajjar, K.A. (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haem.* **129**, 307–321, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x>
- 53 Ogiwara, K., Nogami, K., Nishiya, K. and Shima, M. (2010) Plasmin-induced procoagulant effects in the blood coagulation: a crucial role of coagulation factors V and VIII. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **21**, 568–576, <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32833c9a9f>
- 54 Barthel, D., Schindler, S. and Zipfel, P.F. (2012) Plasminogen is a complement inhibitor. *J. Biol. Chem.* **287**, 18831–18842, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323287>
- 55 Principe, M., Borgoni, S., Cascione, M., Chattaragada, M.S., Ferri-Borgogno, S., Capello, M. et al. (2017) Alpha-enolase (EN01) controls alpha v/beta 3 integrin expression and regulates pancreatic cancer adhesion, invasion, and metastasis. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 16, <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0385-8>
- 56 Miles, L.A. and Parmer, R.J. (2013) Plasminogen receptors: the first quarter century. *Semin. Thromb. Hemost.* **39**, 329–337, <https://doi.org/10.1055/s-0033-1334483>
- 57 Sanderson-Smith, M.L., De Oliveira, D.M., Ranson, M. and McArthur, J.D. (2012) Bacterial plasminogen receptors: mediators of a multifaceted relationship. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 272148, <https://doi.org/10.1155/2012/272148>
- 58 Didiasova, M., Wujak, L., Wygrecka, M. and Zakrzewicz, D. (2014) From plasminogen to plasmin: role of plasminogen receptors in human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 21229–21252, <https://doi.org/10.3390/ijms151121229>
- 59 Kwaan, H.C. and McMahon, B. (2009) The role of plasminogen-plasmin system in cancer. *Cancer Treat. Res.* **148**, 43–66, [https://doi.org/10.1007/978-0-387-79962-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-79962-9_4)
- 60 Godier, A. and Hunt, B.J. (2013) Plasminogen receptors and their role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune and malignant disease. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 26–34, <https://doi.org/10.1111/jth.12064>
- 61 Ceruti, P., Principe, M., Capello, M., Cappello, P. and Novelli, F. (2013) Three are better than one: plasminogen receptors as cancer theranostic targets. *Exp. Hematol. Oncol.* **2**, 12, <https://doi.org/10.1186/2162-3619-2-12>
- 62 Oh, C.W., Hoover-Plow, J. and Plow, E.F. (2003) The role of plasminogen in angiogenesis *in vivo*. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 1683–1687, <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00182.x>
- 63 Perides, G., Zhuge, Y., Lin, T., Stins, M.F., Bronson, R.T. and Wu, J.K. (2006) The fibrinolytic system facilitates tumor cell migration across the blood-brain barrier in experimental melanoma brain metastasis. *BMC Cancer* **6**, 56, <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-56>
- 64 Almholt, K., Juncker-Jensen, A., Larum, O.D., Johnsen, M., Römer, J. and Lund, L.R. (2013) Spontaneous metastasis in congenic mice with transgenic breast cancer is unaffected by plasminogen gene ablation. *Clin. Exp. Metastasis* **30**, 277–288, <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9534-9>
- 65 Martínez-García, S., Rodríguez-Martínez, S., Cancino-Diaz, M.E. and Cancino-Diaz, J.C. (2018) Extracellular proteases of *Staphylococcus epidermidis*: roles as virulence factors and their participation in biofilm. *APMIS* **126**, 177–185, <https://doi.org/10.1111/apm.12805>
- 66 Vieira, M.L., Atzingen, M.V., Oliveira, R., Mendes, R.S., Domingos, R.F., Vasconcelos, S.A. et al. (2012) Plasminogen binding proteins and plasmin generation on the surface of *Leptospira* spp.: the contribution to the bacteria-host interactions. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 758513, <https://doi.org/10.1155/2012/758513>

- 67 Chen, H., Yu, S., Shen, X., Chen, D., Qiu, X., Song, C. et al. (2011) The *Mycoplasma gallisepticum*  $\alpha$ -enolase is cell surface-exposed and mediates adherence by binding to chicken plasminogen. *Microb. Pathog.* **51**, 285–290, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.03.012>
- 68 Gründel, A., Friedrich, K., Pfeiffer, M., Jacobs, E. and Dumke, R. (2015) Subunits of the pyruvate dehydrogenase cluster of *Mycoplasma pneumoniae* are surface-displayed proteins that bind and activate human plasminogen. *PLoS ONE* **10**, e0126600, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126600>
- 69 Castiblanco-Valencia, M.M., Fraga, T.R., Pagotto, A.H., Serrano, S.M., Abreu, P.A., Barbosa, A.S. et al. (2016) Plasmin cleaves fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of *Leptospira interrogans* proteins: a new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. *Immunobiology* **221**, 679–689, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.01.001>
- 70 Siqueira, G.H., Atzingen, M.V., de Souza, G.O., Vasconcellos, S.A. and Nascimento, A.L. (2016) *Leptospira interrogans* Lsa23 protein recruits plasminogen, factor H and C4BP from normal human serum and mediates C3b and C4b degradation. *Microbiology* **162**, 295–308, <https://doi.org/10.1099/mic.0.000217>
- 71 Kukkonen, M., Saarela, S., Lähteenmäki, K., Hynönen, U., Westerlund-Wikström, B., Rhen, M. et al. (1998) Identification of two laminin-binding fimbriae, the type 1 fimbria of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and the G fimbria of *Escherichia coli*, as plasminogen receptors. *Infect. Immun.* **66**, 4965–4970
- 72 Fuchs, H., Wallich, R., Simon, M.M. and Kramer, M.D. (1994) The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin (ogen) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12594–12598, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12594>
- 73 Koenigs, A., Hammerschmidt, C., Jutras, B.L., Pogoryelov, D., Barthel, D., Skerka, C. et al. (2013) BBA70 of *Borrelia burgdorferi* is a novel plasminogen-binding protein. *J. Biol. Chem.* **288**, 25229–25243, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.413872>
- 74 Önder, Ö., Humphrey, P.T., McOmber, B., Korobova, F., Francella, N., Greenbaum, D.C. et al. (2012) OspC is potent plasminogen receptor on surface of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* **287**, 16860–16868, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290775>
- 75 Hallström, T., Haupt, K., Kraiczy, P., Hortschansky, P., Wallich, R., Skerka, C. et al. (2010) Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. *J. Infect. Dis.* **202**, 490–498, <https://doi.org/10.1086/653825>
- 76 Brissette, C.A., Haupt, K., Barthel, D., Cooley, A.E., Bowman, A., Skerka, C. et al. (2009) *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. *Infect. Immun.* **77**, 300–306, <https://doi.org/10.1128/IAI.01133-08>
- 77 Seling, A., Siegel, C., Fingerle, V., Jutras, B.L., Brissette, C.A., Skerka, C. et al. (2010) Functional characterization of *Borrelia spielmanii* outer surface proteins that interact with distinct members of the human factor H protein family and with plasminogen. *Infect. Immun.* **78**, 39–48, <https://doi.org/10.1128/IAI.00691-09>
- 78 Xolalpa, W., Vallecillo, A.J., Lara, M., Mendoza-Hernandez, G., Comini, M., Spallek, R. et al. (2007) Identification of novel bacterial plasminogen binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* **7**, 3332–3341, <https://doi.org/10.1002/pmic.200600876>
- 79 De la Paz Santangelo, M., Gest, P.M., Guerin, M.E., Coignon, M., Pham, H., Ryan, G. et al. (2011) Glycolytic and non-glycolytic functions of *Mycobacterium tuberculosis* fructose-1,6-bisphosphate aldolase, an essential enzyme produced by replicating and non-replicating bacilli. *J. Biol. Chem.* **286**, 40219–40231, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.259440>
- 80 Verma, A., Brissette, C.A., Bowman, A.A., Shah, S.T., Zipfel, P.F. and Stevenson, B. (2010) Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect. Immun.* **78**, 2053–2059, <https://doi.org/10.1128/IAI.01282-09>
- 81 Oliveira, R., Maria de Moraes, Z., Gonçalves, A.P., Romero, E.C., Vasconcellos, S.A. and Nascimento, A.L.T.O. (2011) Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. *PLoS ONE* **6**, e21962, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021962>
- 82 Vieira, M.L., Atzingen, M.V., Oliveira, T.R., Oliveira, R., Andrade, D.M., Vasconcellos, S.A. et al. (2010) *In vitro* identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. *PLoS ONE* **5**, e11259, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011259>
- 83 Wolff, D.G., Castiblanco-Valencia, M.M., Abe, C.M., Monaris, D., Moraes, Z.M., Souza, G.O. et al. (2013) Interaction of *Leptospira* elongation factor Tu with plasminogen and complement factor H: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. *PLoS ONE* **8**, e81818, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081818>
- 84 Fernandes, L.G., Vieira, M.L., Alves, I.J., de Moraes, Z.M., Vasconcellos, S.A., Romero, E.C. et al. (2014) Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp. *Microbiology* **160**, 149–164, <https://doi.org/10.1099/mic.0.072074-0>
- 85 Pancholi, V. and Fischetti, V.A. (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* **176**, 415–426, <https://doi.org/10.1084/jem.176.2.415>
- 86 Bergmann, S., Rohde, M. and Hammerschmidt, S. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect. Immun.* **72**, 2416–2419, <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2416-2419.2004>
- 87 Moreau, C., Terrasse, R., Thielens, N.M., Vernet, T., Gaboriaud, C. and Di Guilmi, A.M. (2017) Deciphering key residues involved in the virulence-promoting interactions between *Streptococcus pneumoniae* and human plasminogen. *J. Biol. Chem.* **292**, 2217–2225, <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.764209>
- 88 Matta, S.K., Agarwal, S. and Bhatnagar, R. (2010) Surface localized and extracellular Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 2111–2120, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.08.004>
- 89 Hurmalainen, V., Edelman, S., Antikainen, J., Baumann, M., Lähteenmäki, K. and Korhonen, T.K. (2007) Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. *Microbiology* **153**, 1112–1122, <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/000901-0>
- 90 Glenting, J., Beck, H.C., Vrang, A., Riemann, H., Ravn, P., Hansen, A.M. et al. (2013) Anchorless surface associated glycolytic enzymes from *Lactobacillus plantarum* 299v bind to epithelial cells and extracellular matrix proteins. *Microbiol. Res.* **168**, 245–253, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.01.003>
- 91 Matsunaga, N., Shimizu, H., Fujimoto, K., Watanabe, K., Yamasaki, T., Hatano, N. et al. (2018) Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of *Clostridium perfringens* cells. *Anaerobe* **51**, 124–130, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.05.001>

- 92 Zhu, W., Zhang, Q., Li, J., Wei, Y., Cai, C., Liu, L. et al. (2017) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as an adhesin in *Erysipelothrix rhusiopathiae* adhesion to porcine endothelial cells and as a receptor in recruitment of host fibronectin and plasminogen. *Vet. Res.* **48**, 16, <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0421-x>
- 93 Gao, J.Y., Ye, C.L., Zhu, L.L., Tian, Z.Y. and Yang, Z.B. (2014) A homolog of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Riemerella anatipestifer* is an extracellular protein and exhibits biological activity. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* **15**, 776–787, <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400023>
- 94 Aguilera, L., Ferreira, E., Giménez, R., Fernández, F.J., Taulés, M., Aguilar, J. et al. (2012) Secretion of the housekeeping protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the LEE-encoded type III secretion system in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 955–962, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.03.002>
- 95 Knaust, A., Weber, M.V.R., Hammerschmidt, S., Bergmann, S., Frosch, M. and Floden, O.K. (2007) Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **189**, 3246–3255, <https://doi.org/10.1128/JB.01966-06>
- 96 Floden, A.M., Watt, J.A. and Brissette, C.A. (2011) *Borrelia burgdorferi* enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. *PLoS ONE* **6**, e27502, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027502>
- 97 Mundodi, V., Kucknoor, A.S. and Alderete, J.F. (2008) Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated  $\alpha$ -enolase of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* **76**, 523–531, <https://doi.org/10.1128/IAI.01352-07>
- 98 Jong, A.Y., Chen, S.H., Stins, M.F., Kim, K.S., Tuan, T.L. and Huang, S.H. (2003) Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin (ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J. Med. Microbiol.* **52**, 615–622, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05060-0>
- 99 Vastano, V., Capri, U., Candela, M., Siciliano, R.A., Russo, L., Renda, M. et al. (2013) Identification of binding sites of *Lactobacillus plantarum* enolase involved in the interaction with human plasminogen. *Microbiol. Res.* **168**, 65–72, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.10.001>
- 100 Rahi, A., Matta, S.K., Dhiman, A., Garhyan, J., Gopalani, M., Chandra, S. et al. (2017) Enolase of *Mycobacterium tuberculosis* is a surface exposed plasminogen binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 3355–3364, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.08.018>
- 101 Thomas, C., Jacobs, E. and Dumke, R. (2013) Characterization of pyruvate dehydrogenase subunit B and enolase as plasminogen-binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology* **159**, 352–365, <https://doi.org/10.1099/mic.0.061184-0>
- 102 Furuya, H. and Ikeda, R. (2011) Interaction of triosephosphate isomerase from *Staphylococcus aureus* with plasminogen. *Microbiol. Immunol.* **55**, 855–862, <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00392.x>
- 103 Boone, T.J. and Tyrrell, G.J. (2012) Identification of the actin and plasminogen binding regions of group B streptococcal phosphoglycerate kinase. *J. Biol. Chem.* **287**, 29035–29044, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.361261>
- 104 Shams, F., Oldfield, N.J., Lai, S.K., Tunio, S.A., Wooldridge, K.G. and Turner, D.P.J. (2016) Fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis* binds human plasminogen via its C-terminal lysine residue. *Microbiol. Open* **5**, 340–350, <https://doi.org/10.1002/mbo3.331>
- 105 Knaust, A., Weber, M.V., Hammerschmidt, S., Bergmann, S., Frosch, M. and Kurzai, O. (2007) Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **189**, 3246–3255, <https://doi.org/10.1128/JB.01966-06>
- 106 Wiles, K.G., Panizzi, P., Kroh, H.K. and Bock, P.E. (2010) Skizzle is a novel plasminogen- and plasmin-binding protein from *Streptococcus agalactiae* that targets proteins of human fibrinolysis to promote plasmin generation. *J. Biol. Chem.* **285**, 21153–21164, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107730>
- 107 Crowe, J.D., Sievwright, I.K., Auld, G.C., Moore, N.R., Gow, N.A. and Booth, N.A. (2003) *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **47**, 1637–1651, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03390.x>
- 108 Karkowska-Kuleta, J., Zajac, D., Bras, G., Bochenska, O., Rapala-Kozik, M. and Kozik, A. (2017) Binding of human plasminogen and high-molecular-mass kininogen by cell surface-exposed proteins of *Candida parapsilosis*. *Acta Biochim. Pol.* **64**, 391–400, <https://doi.org/10.18388/abp.20171609>
- 109 Stie, J., Bruni, G. and Fox, D. (2009) Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus neoformans* promotes extracellular matrix invasion. *PLoS ONE* **4**, e5780, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005780>
- 110 Funk, J., Schaarschmidt, B., Slesiona, S., Hallström, T., Horn, U. and Brock, M. (2016) The glycolytic enzyme enolase represents a plasminogen-binding protein on the surface of a wide variety of medically important fungal species. *Int. J. Med. Microbiol.* **306**, 59–68, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.11.005>
- 111 Marcos, C.M., de Fátima da Silva, J., de Oliveira, H.C., Moraes da Silva, R.A., Mendes-Giannini, M.J. and Fusco-Almeida, A.M. (2012) Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. *FEMS Yeast Res.* **12**, 557–570, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00806.x>
- 112 Nogueira, S.V., Fonseca, F.L., Rodrigues, M.L., Mundodi, V., Abi-Chacra, E.A., Winters, M.S. et al. (2010) *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun.* **78**, 4040–4050, <https://doi.org/10.1128/IAI.00221-10>
- 113 Fox, D. and Smulian, A.G. (2001) Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. *Med. Mycol.* **39**, 495–507, <https://doi.org/10.1080/mmy.39.6.495.507>
- 114 Luo, S., Poltermann, S., Kunert, A., Rupp, S. and Zipfel, P.F. (2009) Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol. Immunol.* **47**, 541–550, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.07.017>
- 115 Poltermann, S., Kunert, A., von der Heide, M., Eck, R., Hartmann, A. and Zipfel, P.F. (2007) Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **282**, 37537–37544, <https://doi.org/10.1074/jbc.M707280200>
- 116 Chaves, E.G., Weber, S.S., Bão, S.N., Pereira, L.A., Bailão, A.M., Borges, C.L. et al. (2015) Analysis of *Paracoccidioides* secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein. *BMC Microbiol.* **27**, 53, <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0393-9>
- 117 Ikeda, R., Ichikawa, T., Miyazaki, Y., Shimizu, N., Ryoko, T., Haru, K. et al. (2014) Detection and characterization of plasminogen receptors on clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *FEMS Yeast Res.* **14**, 1186–1195, <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12215>

- 118 Ikeda, R. and Ichikawa, T. (2014) Interaction of surface molecules on *Cryptococcus neoformans* with plasminogen. *FEMS Yeast Res.* **14**, 445–450, <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12131>
- 119 Stie, J. and Fox, D. (2014) Blood-brain barrier invasion by *Cryptococcus neoformans* is enhanced by functional interactions with plasmin. *Microbiology* **158**, 240–258, <https://doi.org/10.1099/mic.0.051524-0>
- 120 Calcagno, M., Avilán, L., Colasante, C., Berrueta, L. and Salmen, S. (2002) Interaction of different *Leishmania mexicana* morphotypes with plasminogen. *Parasitol. Res.* **88**, 972–978, <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0688-2>
- 121 Maldonado, J., Calcagno, M., Puig, J., Maizo, Z. and Avilán, L. (2006) A study of cutaneous lesions caused by *Leishmania mexicana* in plasminogen-deficient mice. *Exp. Mol. Pathol.* **80**, 289–294, <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.06.005>
- 122 Vanegas, G., Quiñones, W., Carrasco-López, C., Concepción, J.L., Albericio, F. and Avilán, L. (2007) Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitol. Res.* **101**, 1511–1516, <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0668-7>
- 123 Quiñones, W., Peña, P., Domingo-Sananes, M., Cáceres, A., Michels, P.A., Avilán, L. et al. (2007) *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. *Exp. Parasitol.* **116**, 241–251, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.008>
- 124 Gómez-Arreaza, A., Acosta, H., Barros-Álvarez, X., Concepción, J.L., Albericio, F. and Avilán, L. (2011) *Leishmania mexicana*: LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated C-kinase) is a plasminogen binding protein. *Exp. Parasitol.* **127**, 752–761, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.01.008>
- 125 Bhowmick, I.P., Vora, H.K. and Jaroni, G.K. (2007) Sub-cellular localization and post-translational modifications of the *Plasmodium yoelii* enolase suggest moonlighting functions. *Malar. J.* **16**, 45, <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-45>
- 126 Ghosh, A.K., Coppens, I., Gårdsvoll, H., Ploug, M. and Jacobs-Lorena, M. (2011) *Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 17153–17158, <https://doi.org/10.1073/pnas.1103657108>
- 127 Almeida, L., Vanegas, G., Calcagno, M., Concepción, J.L. and Avilán, L. (2004) Plasminogen Interaction with *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **99**, 63–67, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000100011>
- 128 Rojas, M., Labrador, I., Concepción, J.L., Aldana, E. and Avilán, L. (2008) Characteristics of plasminogen binding to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Acta Trop.* **107**, 54–58, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.013>
- 129 Acosta, H., Rondón-Mercado, R., Avilán, L. and Concepción, J.L. (2016) Interaction of *Trypanosoma evansi* with the plasminogen-plasmin system. *Vet. Parasitol.* **226**, 189–197, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.016>
- 130 Lama, A., Kucknoor, A., Mundodi, V. and Alderete, J.F. (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* **77**, 2703–2711, <https://doi.org/10.1128/IAI.00157-09>
- 131 Roggwiler, E., Fricaud, A.C., Blisnick, T. and Braun-Bretton, C. (1997) Host urokinase-type plasminogen activator participates in the release of malaria merozoites from infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **86**, 49–59, [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)02848-X](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)02848-X)
- 132 Schuindt, S.H., Oliveira, B.C., Pimentel, P.M., Resende, T.L., Retamal, C.A., DaMatta, R.A. et al. (2012) Secretion of multi-protein migratory complex induced by *Toxoplasma gondii* infection in macrophages involves the uPA/uPAR activation system. *Vet. Parasitol.* **186**, 207–215, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.035>
- 133 González-Miguel, J., Morchón, R., Siles-Lucas, M., Oleaga, A. and Simón, F. (2015) Surface-displayed glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and galectin from *Diriofilaria immitis* enhance the activation of the fibrinolytic system of the host. *Acta Trop.* **145**, 8–16, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.01.010>
- 134 Jolodar, A., Fischer, P., Bergmann, S., Büttner, D.W., Hammerschmidt, S. and Brattig, N.W. (2003) Molecular cloning of an alpha-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. *Biochim. Biophys. Acta* **1627**, 111–120, [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(03\)00083-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(03)00083-6)
- 135 Ertmann, K.D., Kleinsang, A., Schneider, E., Hammerschmidt, S., Büttner, D.W. and Gallin, M. (2005) Cloning, characterization and DNA immunization of an *Onchocerca volvulus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Ov-GAPDH). *Biochim. Biophys. Acta* **1741**, 85–94, <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2004.12.010>
- 136 Hu, Y., Zhang, E., Huang, L., Li, W., Liang, P., Wang, X. et al. (2014) Expression profiles of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Clonorchis sinensis*: a glycolytic enzyme with plasminogen binding capacity. *Parasitol. Res.* **113**, 4543–4553, <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4144-x>
- 137 He, L., Ren, M., Chen, X., Wang, X., Li, S., Lin, J. et al. (2014) Biochemical and immunological characterization of annexin B30 from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products. *Parasitol. Res.* **113**, 2743–2755, <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3935-4>
- 138 Bernal, D., de la Rubia, J.E., Carrasco-Abad, A.M., Toledo, R., Mas-Coma, S. and Marcilla, A. (2004) Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory/secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Lett.* **563**, 203–206, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00306-0)
- 139 Ramajo-Hernández, A., Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Martín, V. and Oleaga, A. (2007) *Schistosoma bovis*: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Exp. Parasitol.* **115**, 83–91, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.07.003>
- 140 Li, W.H., Qu, Z.G., Zhang, N.Z., Yue, L., Jia, W.Z., Luo, J.X. et al. (2015) Molecular characterization of enolase gene from *Taenia multiceps*. *Res. Vet. Sci.* **102**, 53–58, <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.06.013>
- 141 Zhang, S., You, Y., Luo, X., Zheng, Y. and Cai, X. (2018) Molecular and biochemical characterization of *Taenia solium*  $\alpha$ -enolase. *Vet. Parasitol.* **254**, 36–42, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.041>
- 142 Ayón-Núñez, D.A., Fragoso, G., Espitia, C., García-Varela, M., Soberón, X., Rosas, G. et al. (2018) Identification and characterization of *Taenia solium* enolase as a plasminogen-binding protein. *Acta Trop.* **182**, 69–79, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.020>
- 143 Figueiredo, B.C., Dádara, A.A., Oliveira, S.C. and Skelly, P.J. (2015) Schistosomes enhance plasminogen activation: the role of tegumental enolase. *PLoS Pathog.* **11**, e1005335, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005335>
- 144 Cork, A.J., Ericsson, D.J., Law, R.H., Casey, L.W., Valkov, E., Bertozzi, C. et al. (2015) Stability of the octameric structure affects plasminogen-binding capacity of streptococcal enolase. *PLoS ONE* **10**, e0121764, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121764>

- 145 Akpunarlieva, S., Weidt, S., Lamasudin, D., Naula, C., Henderson, D., Barrett, M. et al. (2017) Integration of proteomics and metabolomics to elucidate metabolic adaptation in *Leishmania*. *J. Proteomics* **155**, 85–98, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.12.009>
- 146 White, Jr, A.C., Molinari, J.L., Pillai, A.V. and Rege, A.A. (1992) Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacystode proteases. *J. Parasitol.* **78**, 281–287, <https://doi.org/10.2307/3283475>
- 147 Flisser, A., Rodriguez-Canul, R. and Willingham, III, A.L. (2006) Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments. *Vet. Parasitol.* **139**, 283–292, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.019>
- 148 Singh, S.K., Singh, A.K., Prasad, K.N., Singh, A., Singh, A., Rai, R.P. et al. (2015) Expression of adhesion molecules, chemokines and matrix metalloproteinases (MMPs) in viable and degenerating stage of *Taenia solium* metacystode in swine neurocysticercosis. *Vet Parasitol.* **214**, 59–66, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.017>
- 149 Zimic, M.J., Infantes, J., López, C., Velásquez, J., Farfán, M., Pajuelo, M. et al. (2007) Comparison of the peptidase activity in the oncosphere excretory/secretory products of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *J. Parasitol.* **93**, 727–734, <https://doi.org/10.1645/GE-959R.1>