
Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	iii
INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	2
1.1 Helmintos.....	2
1.2 <i>Echinococcus granulosus</i> y echinococcosis quística	5
1.3 Metabolismo de xenobióticos	7
1.3.1 Consideraciones generales.....	7
1.3.2 Metabolismo de xenobióticos en helmintos.....	11
1.4 Glutación transferasas	13
1.4.1 Consideraciones generales.....	13
1.4.2 Glutación transferasas en helmintos.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo general.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
SECCIÓN I.- IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA GLUTATIÓN TRANSFERASA DE <i>Echinococcus granulosus</i>	
1 INTRODUCCIÓN	20
1.1 Glutación transferasas de clase Sigma.....	20
1.2 Glutación transferasas en <i>E. granulosus</i>	23
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1 Material parasitario	24
2.2 Bacterias y medios de cultivo	24

2.3	Obtención de ADN copia y clonado.....	25
2.3.1	Preparación de células electrocompetentes.....	25
2.3.2	Extracción de ARN	26
2.3.3	Síntesis de ADN copia (ADNc).....	26
2.3.4	Amplificación de los ADNc y clonado	26
2.4	Metodos informáticos de análisis de genes y proteínas	28
2.4.1	Búsqueda de GSTs citosólicas en bases de datos.....	28
2.4.2	Estimación de punto isoelectrico, peso molecular,y peptido señal de secreción y predicción modificaciones postraduccionales	31
2.4.3	Predicción de la estructura secundaria	31
2.4.4	Estructura exón/intrón del gen <i>EgGST2</i>	31
2.4.5	Alineamiento de secuencias y construcción del árbol filogenético	31
2.4.6	Analisis de dominios y aminoácidos conservados.....	32
2.5	Producción de proteínas recombinantes.....	32
2.5.1	Preparación de las células competentes y transformación por choque térmico	32
2.5.2	Producción de EgGST2r	32
2.5.3	Purificación de EgGST2r.....	33
2.6	Actividad glutatión transferasa.....	34
2.7	Producción de sueros policlonales anti-EgGST2.....	34
2.7.1	Purificación de EgGST2 en cuerpos de inclusión.....	34
2.7.2	Producción de sueros de conejo anti EgGST2r.....	34
3	RESULTADOS.....	35
3.1	Clonado del gen <i>EgGST2</i>	35
3.2	Análisis de la estructura exón/intrón del gen de <i>EgGST2</i>	37
3.3	Clasificación de <i>EgGST2</i>	38

SECCIÓN III.- ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE LAS GLUTATIÓN TRANSFERASAS DE *E. granulosus*

1	INTRODUCCIÓN	84
1.1	Inducción de la expresión de enzimas glutatión transferasas.....	84
1.1.1	Receptor de hidrocarburos arilo	85
1.1.2	Factor nuclear- eritroide 2- relacionado al factor 2	87
1.1.3	Receptor de androstanos constitutivo y Receptor X de pregnanos.....	89
1.1.4	Receptor activado por ploliferadores de peroxisomas	91
1.1.5	Inducción de enzimas detoxificantes en helmintos	91
2	MATETRIALES Y MÉTODOS	94
2.1	Identificación de secuencias reguladoras en las regiones 5' flanqueantes de los genes <i>EgGST</i>	94
2.1.1	Obtención de las secuencias 5' flanqueantes	94
2.1.2	Búsqueda de posibles elementos reguladores.....	94
2.2	Estudio de la expresión de <i>EgGSTs</i>	94
2.2.1	Material Parasitario	94
2.2.2	Animales	95
2.2.3	Cultivos <i>in vitro</i>	95
2.2.4	Infecciones experimentales y lavado de cavidad peritoneal	95
2.3	qRT-PCR para las GST de <i>E. granulosus</i>	96
2.3.1	Extracción de ARN	96
2.3.2	Tratamiento con DNAsa	96
2.3.3	Retrotranscripción	96
2.3.4	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	96
3	RESULTADOS	98
3.1	Análisis bioinformático de las secuencias 5' de los genes <i>EgGSTs</i>	98

3.2	Diseño de cebadores para amplificación por PCR en tiempo real de las EgGSTs y genes constitutivos.....	113
3.3	Puesta a punto del análisis por PCR en tiempo real (qRT-PCR) a partir de cDNA de protoescoléx de <i>E. granulosus</i>	114
3.3.1	Especificidad de los cebadores.....	114
3.3.2	Validación de la cuantificación relativa por el método $\Delta\Delta C_T$	114
3.4	Análisis <i>in vitro</i> de la expresión de las glutatión transferasas en protoscolex de <i>E. granulosus</i>	116
3.4.1	Control de la expresión basal de las EgGSTs en protoescoléx en cultivo.....	116
3.4.2	Evaluación de la Expresión de las EgGST frente al estrés oxidativo/nitrativo.....	118
3.4.3	Efecto de compuestos xenobióticos sobre la expresión de las EgGST... ..	121
3.5	Expresión de las EgGST en el contexto de la infección.....	125
4	DISCUSIÓN.....	127
DISCUSIÓN GENERAL		
1.	GLUTATIÓN TRANSFERASAS DE <i>Echinococcus granulosus</i>: buscando sus funciones biológicas	134
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138