TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN 1

1.1 Echinococcus granulosus 1

1.1.1 Ciclo de vida 1

1.1.2 Respuestas de los hospederos 2

1.2 Estrés oxidativo 5

1.2.1 Especies reactivas del oxígeno 5

1.2.2 Especies reactivas del nitrógeno 7

1.2.3 Defensas de la célula ante el estrés oxidativo 7

1.3 Balance redox intracelular 8

1.3.1 Tioles celulares 8

1.3.2 Sistemas tiorredoxina y glutarredoxina 10

1.4.3 Un caso excepcional: tripanotión / tripanotión reductasa 11

1.4 El Sistema Tiorredoxina 12

1.4.1 La Tiorredoxina Reductasa 12

1.4.1.1 Primeras caracterizaciones moleculares de TR *mayores* 12

1.4.1.2 Sobre el mecanismo de acción de las TR-Se 15

1.4.1.3 La selenocisteína y su mecanismo de incorporación 17

1.4.1.4 Isoformas en TR de mamíferos 18

1.4.1.5 Algunos elementos evolutivos de las TR 18

1.4.1.6 Funciones biológicas de TR de mamíferos 19

1.4.2 La Tiorredoxina 20

1.4.2.1 Mecanismo de acción de las Trx 21

1.4.2.2 Isoformas de las Trx 21

1.4.2.3 Funciones biológicas de las Trx 22

1.4.3 Un blanco del Sistema tiorredoxina: la Tiorredoxina Peroxidasa 23

1.5 Parásitos y estrés oxidativo 24

1.5.1 Defensas de los helmintos frente al estrés oxidativo generado por inflamación 24

1.5.2 El sistema tiorredoxina en parásitos 27

MATERIALES Y MÉTODOS 29

2.1 Materiales 29

2.1.1 Genotecas 29

2.1.2 Material parasitario 29

2.1.3 Cepas de bacterias 29

2.1.4 Oligonucleótidos 29

2.2 Técnicas generales 31

2.2.1 Extracción de ARN de protoscólex y transcripción reversa 31

2.2.2 Amplificación por PCR: obtención de fragmentos del gen de la *Eg*TR 32

2.2.3 Purificación de fragmentos de ADN 32

2.2.4 Clonado de fragmentos amplificados 32
2.2.5 Transformación de bacterias 33
2.2.6 *Screening* rápido de células transformadas 33
2.2.7 Extracción de ADN plasmídico 33
2.2.8 Digestión con endonucleasas 33
2.2.9 Secuenciación manual 34
2.2.10 Análisis de secuencias 34
2.2.11 Extracto acuoso de protoescólex 35
2.2.12 Dosificación de proteínas 35
2.2.13 Electroforesis de proteínas 35
2.3 Técnicas específicas 35
2.3.1 Obtención del extremo 5' del gen de la *Eg*TR por *RACE* 35
2.3.2 Preparación de una sonda de ADN para *Northern blot* 35
2.3.3 Northern blot 36
2.3.4 Clonado en el vector de expresión $pMAL_{C-2}$ 36
2.3.4.1 Las secuencias codificantes para la *Eg*Trx y *Eg*TPx, y su clonado en $pMAL_{C-2}$ 37
2.3.4.2 Selección de $pMAL_{C-2}$ recombinantes con insertos en orientación correcta 37
2.3.4.3 Proteínas de fusión: inducción de la expresión y extracción 38
2.3.4.4 Purificación por matriz de amilosa de las proteínas de fusión 38
2.3.4.5 Digestión con factor Xa 38
2.3.4.6 Purificación de la *Eg*Trx recombinante por intercambio iónico 39
2.3.5 Clonado en el vector de expresión pET-28a 39
2.3.5.1 Las secuencias codificantes de *Eg*TPx y Δ*Eg*TR, y su clonado en pET28a 40
2.3.5.2 Selección de pET28a recombinantes con un marco abierto de lectura correcto 40
2.3.5.3 Proteína de fusión: inducción de la expresión y extracción 40
2.3.5.4 Purificación por matriz de níquel-agarosa de proteínas de fusión 40
2.3.5.5 Purificación de cuerpos de inclusión con proteínas de fusión 41
2.3.6 Protocolo de inmunización 41
2.3.7 Inmuno blot 41
2.3.8 Actividad Trx 42
2.3.9 Actividad TR 42
2.3.10 Actividad de TPx 42
2.3.11 Enriquecimiento de TR por afinidad con 2', 5' ADP agarosa 43
OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN DE LA TIORREDOXINA REDUCTASA DE E. GRANULOSUS 44
3.1 Clonado de un fragmento del gen de la tiorredoxina reductasa 44
3.1.1 Estrategia 44
3.1.2 Obtención de un fragmento de la *Eg*TR 45

3.1.2.1 Confirmación de la identidad de los fragmentos obtenidos por PCR 46
Secuencia del fragmento de 0.7 kpb 47
3.1.3 Obtención del extremo 3' del gen de *Eg*TR 47
3.1.4 Obtención del extremo 5' del gen de la *Eg*TR 48
Búsqueda del extremo 5' del gen de la EgTR, a partir de ADNc 48
3.1.5 El gen de la *Eg*TR 48
3.1.5.1 Northern blot 49
3.2 Traducción teórica de la EgTR 49
3.3 La EgTR es una nucleótido de piridina disulfuro oxidorreductasa con Sec 51
3.3.1 Dominios de nucleótido de piridina disulfuro oxidorreductasas 51
3.3.2 El motivo GCXG y el elemento SECIS 52
3.4 Analísis filogénetico de la EgTR 53
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DEL SISTEMA TIORREDOXINA DE E. GRANULOSUS 55
4.1 Producción de la EgTrx recombinante 55
4.1.1 Clonado en pMAL$_{c-2}$ de la *Eg*Trx 55
4.1.1.1 Expresión y purificación de la *Eg*Trx recombinante 56
4.1.2 Actividad de la *Eg*Trx recombinante 56
4.2 Producción de la EgTPx recombinante 57
4.2.1 Clonado de *Eg*TPx en pMALc$_2$ 57
4.2.1.1 Expresión y purificación de la MBP::*Eg*TPx 57
4.2.2 Clonado de *Eg*TPx en pET-28a 58
4.2.2.1 Expresión y purificación de la *Eg*TPx recombinante 58
4.2.3 Actividad de la *Eg*TPx recombinante 58
4.3 Producción de un fragmento de la EgTR recombinante 59
4.3.1 Clonado del "fragmento central" de *Eg*TR en pET-28a 59
4.3.1.1 Expresión y purificación de la *Eg*TR recombinante 59
4.4 Obtención de un ADN con la secuencia codificante completa para la EgTR 60
4.4.1 Estrategia 60
4.4.2 Amplificación de la secuencia codificante para la *Eg*TR 61
4.5 Obtención de antisueros contra proteínas del sistema tiorredoxina 62
PROTECCIÓN ANTE LA OXIDACIÓN CATALIZADA POR METALES 64
5.1 Daño al ADN por oxidación catalizada por metales 64
5.1.1 Protección de la MCO por el sistema *Eg*Trx-*Eg*TPx 64
DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS 67
BIBLIOGRAFÍA 70