

Marc 53495

M
AL445C
2004

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA PROTEÍNA DE
MEMBRANA DE *Piscirickettsia salmonis* AISLADA DE
TEJIDOS NATURALMENTE INFECTADOS**



TESIS

Para optar al título profesional de Biólogo Marino

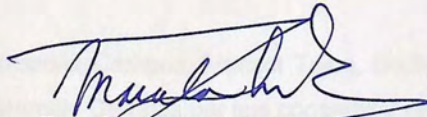
**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

OSCAR A. ALMARZA PIZARRO

2004

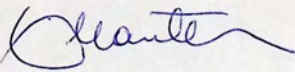
OSCAR A. ALMARZA PIZARRO

Esta Tesis ha sido aprobada por la Comisión de Tesis en Diciembre de 2004

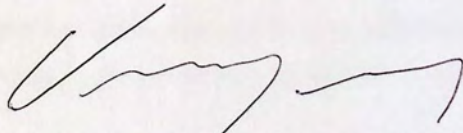


Dra. Marcela Zahr Tajmouch

Director de Tesis



Prof. Gloria Collantes Saa



Dr. Juan Kuznar Hammarstrand

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres: Silvia y Oscar, mis hermanas y familia en general... por su apoyo, cariño, comprensión y sobre todo, por su infinita PACIENCIA a lo largo de la realización de esta tesis.

A la Dra. Marcela Zahr, Directora de esta Tesis, por la confianza depositada en mí y en mi trabajo como tesista e investigador, por los conocimientos entregados y por sobre todo, por la amistad.

A mis amigos y amigas, aquel valioso y heterogéneo grupo de seres que han caminado a mi lado alentando cada uno de mis pasos.

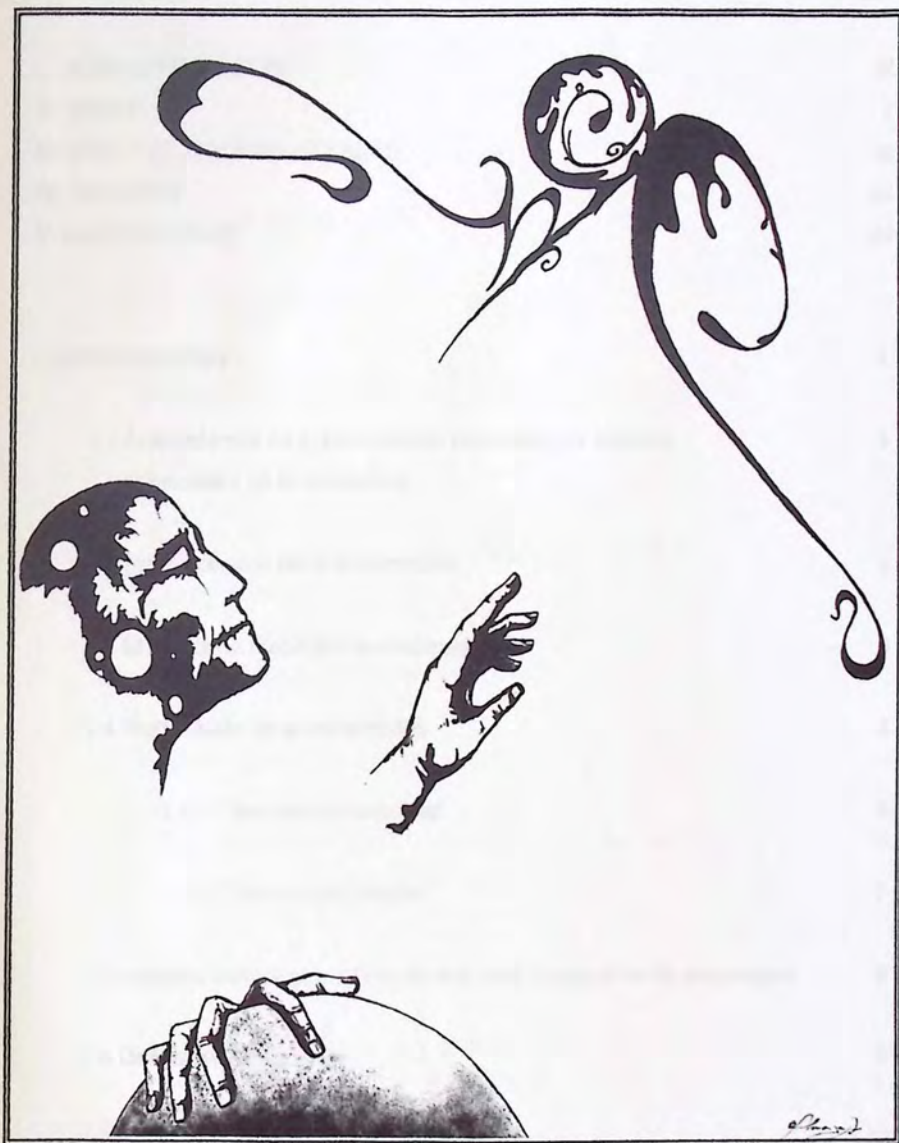
A la Profesora Gloria Collantes y al Dr. Juan Kuznar por su preocupación, y consejos como evaluadores de este trabajo.

A los profesores Bernardita Campos, Marisol Tejos, Guillermina Tapia, Carlos Melo, Pedro Báez y Marcelo Campos por sus consejos y ayuda en las diferentes etapas de mi formación como Biólogo Marino.

A los investigadores, alumnos, asistentes, etc. del Laboratorio de Bioquímica y Virología, y el Centro de Neurociencias de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso; Laboratorio de Inmunología y Genética Molecular, y Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso por la gran disposición al facilitar el uso de equipos y material de laboratorio en la presente investigación.

"La ciencia avanza de puntillas, no a pasos, estos hacen demasiado ruido."

(Anónimo)



per Aspera ad Astra...

Lucius Annaeus Seneca (4 AC-65 DC)

INDICE

	Págs.
I. AGRADECIMIENTOS	iii
II. INDICE	v
III. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	ix
IV. RESUMEN	xii
V. ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes de enfermedades causadas por agentes rickettsiales en la acuicultura	3
1.2 Signos clínicos de la enfermedad	4
1.3 El patógeno <i>Piscirickettsia salmonis</i>	5
1.4 Transmisión de la enfermedad	6
1.4.1 Transmisión horizontal	6
1.4.2 Transmisión vertical	7
1.5 Medidas sanitarias implementadas para el control de la enfermedad	8
1.6 Desarrollo de vacunas	9
1.7 El estudio de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	10
1.8 Características estructurales de la bacteria	11

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	15
3. OBJETIVO GENERAL	16
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Obtención de las muestras.	17
5.2 Método de extracción diferencial con Triton X-114	19
5.3 Extracción de las envolturas celulares: Disrupción celular mecánica.	20
5.4 Métodos de Concentración de Proteínas	21
5.4.1 Concentración mediante el uso de Polietilenglicol/ Precipitación con etanol.	21
5.4.2 Concentración por filtración.	22
5.5 Análisis en geles de poliacrilamida.	23
5.5.1 Preparación de las muestras para electroforesis no denaturante (Native-PAGE).	23
5.5.2 Preparación de las muestras para SDS-PAGE.	24
5.6 Electroforesis bidimensional (focalización isoelectrica).	26
5.7 Tinciones utilizadas.	28
5.7.1 Detección de proteínas.	28
5.7.2 Detección de LPS	28
5.8 Estimación del peso molecular.	29

5.9 Elusión de proteínas desde geles de poliacrilamida.	29
5.9.1 Elusión con bicarbonato de amonio-SDS / Genapol	29
5.9.2 Electroelusión.	30
5.10 Western blot.	31
5.10.1 Revelado colorimétrico.	33
5.10.2 Revelado con Quimioluminiscencia.	33
5.11 Medición de la conductividad de canal.	34
6. RESULTADOS	35
6.1 Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en los ejemplares de estudio	35
6.2 Obtención de los polipéptidos de la membrana externa de la bacteria: Extracción con Triton X-114.	36
6.3 Medición de la actividad de canal	40
6.4 Extracción de las envolturas celulares con el método de disrupción celular mecánica.	43
6.5 Análisis en electroforesis no denaturante (Native-PAGE).	46
6.6 Detección de LPS	47
6.7 Focalización isoeléctrica	47
6.8 Medición de la actividad de canal	48