

Tabla de Contenido

1. Antecedentes generales	1
1.1. Estado del arte	1
1.1.1. Infecciones nosocomiales	1
1.1.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	2
1.1.3. Mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>E. faecalis</i>	2
1.1.4. Respuesta transcripcional global de <i>E. faecalis</i> frente a antibióticos	6
1.1.5. Mecanismos de resistencia y respuesta transcripcional global a cobre en <i>E. faecalis</i>	8
1.1.6. ARNs no codificantes	11
1.1.7. ARNs no codificantes en <i>E. faecalis</i>	13
2. Motivación	15
3. Objetivos	16
3.1. Objetivo general	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. Materiales y Metodología	17
4.1. Materiales	17
4.1.1. Reactivos	17
4.1.2. Instrumentos y elementos	18
4.1.3. Equipos	19
4.1.4. Herramientas Computacionales	20
4.1.5. Microorganismo	20
4.1.6. Composición del Medio de Cultivo	21
4.2. Metodología	21
4.2.1. Etapa 1: Recopilación bibliográfica y uso de herramientas bioinformáticas	21
4.2.1.1. Búsqueda bibliográfica	21
4.2.1.2. Descarga y análisis de datos de RNA-seq	22
4.2.1.3. Comparación de la expresión de transcritos	23
4.2.1.4. Clasificación y selección de los ARNnc candidatos	23
4.2.1.5. Predicción de estructuras de los ARNnc, conservación y codificación de genes blanco	24

4.2.2.	Etapa 2: Validación <i>in vitro</i> y análisis de resultados	24
4.2.2.1.	Crecimiento bacteriano bajo condiciones control	24
4.2.2.2.	Determinación de concentraciones de agentes estresores	24
4.2.2.3.	Extracción de ARN	25
4.2.2.4.	PCR en tiempo real (qPCR)	26
4.2.2.5.	Procesamiento de resultados de qPCR	27
4.2.2.6.	Análisis estadístico	28
5.	Resultados y Discusión	29
5.1.	Identificación <i>in silico</i> de ARNnc	29
5.1.1.	Análisis de datos de RNA-seq	29
5.1.2.	Identificación y comparación de la expresión diferencial de ARNs no codificantes de respuesta a Cu y antibióticos	30
5.1.3.	Selección final de ARNnc	33
5.1.4.	Posición en el genoma de los ARNnc seleccionados con sus blancos de regulación	35
5.1.5.	Análisis de la estructura y conservación de los ARNnc seleccionados	37
5.2.	Validación de abundancia de los ARNnc	41
5.2.1.	Determinación de las condiciones de tratamiento	41
5.2.2.	Extracción de ARN total y diseño de partidores	44
5.2.3.	Cuantificación de los ARNnc en cultivos de <i>E. faecalis</i> expuestos a Cu, vancomicina y ceftriaxona	46
6.	Conclusiones	49
6.1.	Proyecciones	50
	Bibliografía	53
	Anexos	65
A.	Análisis <i>in silico</i>	65
A.1.	Programas utilizados	65
A.2.	Código	65
A.2.1.	Expresión diferencial	77
A.3.	Conservación de los ARNnc	78
B.	Validación de abundancia de los ARNnc	88
B.1.	Diseño de partidores o <i>primers</i>	88