

1 DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta tesis se tuvieron dificultades técnicas por lo que no se cumplió con los objetivos de la misma, sin embargo se sentó un precedente para que se cumplan.

La idea original consistía en determinar mediante hibridaciones tipo Northern qué condiciones nutricionales y medio ambientales activaban la transcripción del pilus Longus.

La principal dificultad se presentó al intentar purificar mRNA, primero se empleó el RNA kit Blue™, de forma preliminar determinamos que la transcripción de lngA se da en la primer hora de incubación al cambiar de un medio líquido a sólido a 37 °C.

Al tratar de extraer RNA cada 20 minutos con el mismo kit, no se obtuvo RNA por lo que se pensó que no se tenía suficiente masa celular, sin embargo al hacer la extracción con otro método (TRIzol), empleando la misma masa celular sí se obtuvo RNA, por lo que las siguientes extracciones se hicieron empleando este método.

Después de obtener todas las muestras y visualizarlas en gel no se veía degradado y se transfirieron bien a la membrana de nylon. Sin embargo al hacer la hibridación tipo Northern, no se obtuvo ninguna señal, lo que indicaba que no había hibridación.

Con el fin de determinar cuál era el problema se hizo lo siguiente: para determinar si no se fijó correctamente, se corrieron en gel las muestras extraídas después de una hora de incubación en los diferentes medios de cultivo, se transfirieron a membrana y se fijaron empleando un aparato específico y se hibridó, pero nuevamente no se obtuvo ninguna señal. Para determinar si realmente la cepa estaba expresando al gen se realizó un RTPCR empleando como molde el RNA extraído con el fin de

amplificar el gen pero no se amplificó, lo que indicó que el RNA extraído no tenía el mensajero de *lngA*.

La cepa de la que se extrajo el RNA es de origen clínico y el plásmido que codifica para *lngA* es natural y no contiene ninguna resistencia a antibiótico por lo que no se puede ejercer ninguna presión selectiva para mantenerlo, y las condiciones del laboratorio posiblemente no favorecen la presencia del plásmido.

Empleado cepas *LngA* positivas en *Western blot*, se realizó un PCR con el fin de determinar cuáles de estas realmente contenían el gen *lngA*, de las que fueron positivas se empleó una para repetir todas las extracciones, con el fin de no cometer el mismo error, se realizaron PCR de la cepa antes de cada extracción en cada medio de cultivo.

En este caso el RNA obtenido estaba degradado, con el fin de determinar si se obtendría una señal después de hacer la hibridación se hizo un dot blot y este fue positivo para todas las muestras.

Empleado la misma cepa nuevamente se hicieron extracciones ahora con el kit RNeasy®. Debido a la falta de tiempo para finalizar el proyecto sólo se realizaron extracciones cada media hora durante las primeras dos horas y sin duplicado. Se obtuvo RNA no degradado.

En este caso después de hacer la hibridación se encontró que únicamente se presentaba hibridación en el área del RNA ribosomal, lo que indica que la sonda está contaminada por tratarse de un producto de PCR no purificado, o bien el mensajero esté muy próximo a los ribosomales, lo cual es poco probable por tratarse de un gen contenido en plásmido. Otra razón puede ser que las condiciones de hibridación no hayan sido las más adecuadas.

Después de estas dificultades técnicas se sugiere que se cambie de metodología para determinar la regulación transcripcional de este gen, una opción es insertar en un

vector de expresión la región reguladora de este gen y monitorear de manera indirecta la regulación transcripcional de este gen en diferentes condiciones de cultivo.

1.1 SUGERENCIA

Una posibilidad para continuar con este trabajo es insertar en un vector de expresión la región reguladora de *lngA* y monitorear de manera indirecta la regulación transcripcional del gen en las diferentes condiciones de cultivo.