

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA DE UNA CEPA
ATENUADA DE *NOCARDIA BRASILIENSIS*”**

POR

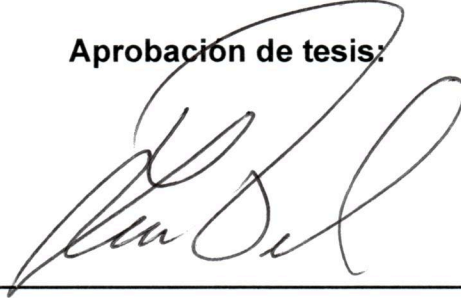
DR. LUIS ÁLVARO GÓMEZ GARCÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA**

DICIEMBRE 2021

**“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA DE UNA CEPA
ATENUADA DE *NOCARDIA BRASILIENSIS*”**

Aprobación de tesis:



**Dr. Lucio Vera Cabrera
Director de la Tesis**



**Dr. Med. Jorge de Jesús Ocampo Candiani
Co-director de la Tesis
Director del Servicio o Departamento
Coordinador de Investigación**



**Dra. Med. Minerva Gómez Flores
Coordinador de Enseñanza**



**Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado**

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi futura esposa, Verónica Ramos Salas, porque siempre estuviste ahí para levantarme cuando estuve a punto de caerme, cuando me faltaban fuerzas tú eras quien me levantaba, me apoyaba y me animaba. A pesar de que los tiempos fueron difíciles jamás te alejaste. Gracias por acompañarme en esta difícil aventura y sé que en el futuro cumpliremos muchas aventuras más.

A mis padres, Luis Gerardo y Yolanda Ivette, por el esfuerzo, tiempo y dedicación que tuvieron conmigo para que yo pudiera lograr mis metas. Han logrado hacerme sentir que por más oscuros que estén los tiempos sé que siempre puedo contar con ustedes. Gracias por darme todas las herramientas necesarias para poder llegar a este momento.

A mis hermanos, Daniel, Pamela y Jesús, a quienes admiro por el trabajo que hacen y que me empujan a ser mejor cada día. Gracias por el apoyo y los consejos que me dan cuando mas los necesité.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi director de tesis, Dr. Lucio Vera Cabrera, por su paciencia, dedicación y enseñanzas. A quien admiro por su hambre de conocimiento y su incansable búsqueda de la verdad a pesar de las adversidades que sufre la investigación.

Agradezco al jefe de servicio, Dr. Med. Jorge Ocampo Candiani. Quien con su ejemplo nos mostró lo que es una persona devota y entregada a su trabajo. Admiro que todos los días es el primero en estar al pendiente del servicio. Agradezco el esfuerzo que ha hecho para convertir a todos los residentes del servicio en unos mejores médicos.

Agradezco a todo el personal de laboratorio Mayra, Carlos, Anabel, Mario, Wendy y la Dra. Carmen por su apoyo e instrucciones para mis experimentos. Admiro mucho su conocimiento y la excelente disponibilidad que tuvieron conmigo durante este viaje.

Agradezco a todos los profesores del servicio por su tiempo y enseñanzas. Por mostrarme con su ejemplo el camino a seguir para convertirme en un excelente médico especialista.

Agradezco a los MPSS Berenice, Karina, Ana y Airam por toda la ayuda que me brindaron durante este proyecto de la tesis. Agradezco la amistad y les deseo mucho éxito. Sé que triunfaran en cualquier trabajo que emprendan.

A mis compañeros de Dermatología, con quienes conviví intensamente estos últimos 4 años, quiero agradecerles su amistad y empatía. Vivimos muchos momentos felices y otros no tanto, pero siempre apoyándonos unos a otros. Los considero mis hermanos y les deseo el mejor de los éxitos en esta nueva etapa.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I	ix
RESUMEN.....	ix
CAPÍTULO II	xi
INTRODUCCIÓN	xi
CAPÍTULO III	xiv
HIPÓTESIS	xiv
CAPÍTULO IV	xv
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	xv
CAPÍTULO V	xvi
MATERIALES Y MÉTODOS.....	xvi
CAPÍTULO VI	xxvii
RESULTADOS.....	xxvii
CAPÍTULO VII	xli
DISCUSIÓN	xli
CAPÍTULO VIII	xlvi
CONCLUSIÓN	xlvi
CAPÍTULO X	xlvii
BIBLIOGRAFÍA	xlvii
CAPÍTULO XI	li
ANEXOS.....	li

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. GENES PERDIDOS DE TWEEN 20 COMPRENDIDOS EN RDNB2.....	XXXIII
TABLA 2. GENES PERDIDOS DE TWEEN 40 LOCALIZADOS EN RDNB2.	XXXV
TABLA 3. GENES PERDIDOS DE TWEEN 80 LOCALIZADOS EN RDNB2.	XXXVI
TABLA 4. GENES PERDIDOS DEL GLICEROL LOCALIZADOS EN RDNB2.	XXXVIII
TABLA 5. GENES PERDIDOS DE D-TREONINA.	XXXIX
TABLA 6. GENES PERDIDOS DE GUANINA.	XL

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. COMPUESTOS EN LOS QUE SE OBSERVARON CAMBIOS ENTRE P0 VS. P200.....	xxviii
FIGURA 2. ENSAYO DE FENOTIPOS POR SUBCULTIVOS.....	xxix
FIGURA 3. REACTIVO DE GLICEROL FOSFATO EN P0 (A), P140 (B) Y P150 (C).....	xxx
FIGURA 4. UBICACION DE LA DELECCION RDNB2,.....	xxxii
FIGURA 5. RUTA METABÓLICA DEL SISTEMA CELULAR DE LA L-CARNITINA.....	xxxii
FIGURA 9. REACTIVO DE TWEEN 20 EN P0 (A), P170 (B) Y P180 (C).....	lxiii
FIGURA 10. REACTIVO DE TWEEN 40 EN P0 (A), P170 (B) Y P180 (C).....	lxiv
FIGURA 11. REACTIVO DE TWEEN 80 EN P0 (A), P160 (B) Y P170 (C).....	lxv
FIGURA 12. REACTIVO DE TWEEN 20 EN P0 (A), P160 (B) Y P170 (C).....	lxvi
FIGURA 13. REACTIVO DE TWEEN 20 EN P0 (A), P140 (B) Y P150 (C).....	lxvii

LISTADO DE ABREVIATURAS

TMP/SMX:	Trimetoprim/sulfametoxazol
<i>N. brasiliensis:</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
RPM:	revoluciones por minuto
Xg:	Fuerza G
µl:	microlitro
RNA:	ácido ribonucleico
DNA:	ácido desoxirribonucleico
Min:	minuto
ml:	mililitro
MgCl₂:	cloruro de magnesio
CaCl₂:	cloruro de calcio
5'-UMP:	Uridina 5' monofosfato
BHI:	Infusión de cerebro corazón
P0:	Cepa de <i>Nocardia brasiliensis</i> original
P200:	Cepa de <i>Nocardia brasiliensis</i> subcultivadas 200 veces
LIID:	Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica
MTB:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
pb:	pares de bases

CAPÍTULO I

RESUMEN

Introducción: El micetoma es una infección crónica que genera un gran aumento de volumen en la parte afectada, aunado a abscesos, fístulas y cicatrices, pudiendo ocasionar una incapacidad permanente. México es un país endémico de *N. brasiliensis*, principal agente causal del micetoma. El objetivo principal de este estudio fue caracterizar el genotipo y fenotipo de dicho microorganismo para mejorar la comprensión de sus mecanismos de virulencia.

Materiales y métodos: El presente es un estudio in vitro, experimental, longitudinal, prospectivo, donde se compararon los cambios fenotípicos de *N. brasiliensis* P0 y P200 con las placas de BIOLOG, Phenotype MicroArrays PM1-PM4, PM11-PM14, PM16-PM18, probando 1,056 reactivos incluyendo fuentes de carbón, nitrógeno, sulfuro, fósforo y antimicrobianos. Posteriormente, se determinó el subcultivo en el que aparecieron los cambios. Asimismo, se compararon las secuencias de material genético de ambas cepas de acuerdo con BioCyc Database Collection con motivo de identificar las rutas metabólicas que sufrieron deleciones y se pudieron relacionar con los cambios fenotípicos.

Resultados: Al comparar el fenotipo entre P0 y P200 de *N. brasiliensis* HUJEG-1, se observaron cambios fenotípicos en los reactivos tween 20, tween 40, tween 80, D-treonina, guanina, β -glicerol fosfato, 1-Tio- β -D-Glucosa, cefazolina, vancomicina, novobiocina, sulfatiazol, sulfametoxazol, 9-aminoacridina, 5-cloro-7-iodo-8-hidroxi-quinolona, sulfanilamida, estreptomina, salicilato de sodio, higromicina B, plumbagina en las placas PM01, PM03, PM04, PM11, PM12, PM14, PM16, PM17 y PM18. Dichos cambios se establecieron como presencia de asimilación del metabolito por P0 y ausencia de la misma en P200. Los presentes cambios comenzaron a observarse a partir de la P150 y están asociados a las rutas metabólicas de la vía de la lanzadera mitocondrial de L-carnitina, biosíntesis de palmitato, biosíntesis de palmitoleato II, biosíntesis de L-

triptófano, degradación de treonina I y vía de degradación de ribonucleósidos de purina I. Esto podría explicar los cambios biológicos asociados al subcultivo.

Conclusión: El subcultivo de *N. brasiliensis* propició la pérdida gradual de fragmentos genéticos que incluyen genes importantes de las rutas metabólicas involucrados en la síntesis de pared celular, lípidos, así como fuentes de carbono, energía, nitrógeno, síntesis de ADN y generación de ATP; los cuales parecen correlacionar con los cambios fenotípicos observados con la pérdida de virulencia de la bacteria.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

El micetoma es una infección crónica, generalmente indolora, la cual se caracteriza por invadir desde la piel a tejidos profundos. La lesión genera un gran aumento de volumen en la parte afectada, aunado a abscesos, fístulas y cicatrices.(1)

La enfermedad tiene un curso lento y progresivo sin regresión espontánea, se puede extender hasta afectar músculos, huesos y órganos; ocasionando una incapacidad permanente.(2)

Las regiones endémicas se encuentran entre las latitudes 15° S y 30° N, las cuales suelen ser áreas tropicales y subtropicales. En México, los actinomicetos son los agentes etiológicos más frecuentes y entre ellos *N. brasiliensis* es la especie predominante. *Nocardia* se caracteriza por ser bacilos gram positivos aerobios, parcialmente ácido alcohol resistentes, que forma ramificaciones.(3,4)

El diagnóstico de micetoma por *Nocardia* se basa en los signos clínicos descritos anteriormente y se confirma mediante cultivo. Otra herramienta diagnóstica utilizada es la detección de material genético mediante PCR.(5)

Actualmente el tratamiento de elección para micetoma es el trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX) el cual ofrece buenos resultados con menos efectos adversos. En pacientes complicados se combina terapia con TMP/SMX y amikacina.(6)

Los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *Nocardia* no son bien

conocidos. Se han descrito algunos, siendo estos las enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa que actúan protegiendo a los microorganismos de los efectos tóxicos de los radicales libres del oxígeno que producen los neutrófilos y macrófagos.(7)

Otros mecanismos de patogenicidad son los ácidos micólicos, ácidos grasos, lipoproteínas y peptidoglicanos de la pared celular de las bacterias produciendo inflamación persistente y daño tisular.(7)

En estudios con microorganismos se ha observado que el subcultivo in vitro de estos microorganismos puede producir cambios importantes en las características fenotípicas incluyendo la eliminación de uno o más factores de virulencia.(8)

El ejemplo clásico de atenuación por subcultivo es el del bacilo Calmette-Guerin un mutante obtenido de *Mycobacterium bovis* atenuado de 230 subcultivos seriados en medio que contenía bilis de buey, la cepa resultante era incapaz de matar animales experimentales y mostró no tener reversión a su estado original.(9)

En nuestro departamento, se han realizado estudios de virulencia en ratones BALB/c con cepas subcultivadas de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 observando una resistencia parcial a la infección mientras mayor era el número de atenuaciones comparadas contra la cepa original, esto se piensa que es debido a una disminución en sus mecanismos de virulencia.(10)

Al secuenciar el genoma completo de la cepa subcultivada 200 veces (P200) y compararlo con la cepa parental, se observó una pérdida de material genético de 262,913 pares de bases distribuidas en 19 regiones. Entre estos genes perdidos se encontraron varios que codifican para catalasas, y nitrato

reductasa, las cuales se han observado, en otros microorganismos, que son importantes mecanismos de virulencia.(10)

Justificación

Los factores de virulencia de *N. brasiliensis* no son bien conocidos. En estudios previos se ha observado que la atenuación de bacterias mediante subcultivos disminuye su capacidad de virulencia y patogenicidad. En este estudio se identificaron los genes de virulencia de *Nocardia brasiliensis* mediante la comparación fenotípica de la bacteria en su forma parental (HUJEG-1, P0) y su forma atenuada (HUJEG-1, P200). Al comparar fenotípicamente las cepas se observaron diferencias metabólicas que puedan explicar el cambio en virulencia.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS VERDADERA

La expresión fenotípica de *Nocardia brasiliensis* se modificará mediante los subcultivos atenuados de la bacteria, lo cual repercutirá en cambios biológicos.

HIPÓTESIS NULA

La expresión fenotípica de *Nocardia brasiliensis* no se modificará mediante los subcultivos atenuados de la bacteria, lo cual no repercutirá en los cambios biológicos.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

Describir la expresión fenotípica y genética de una cepa atenuada de *Nocardia brasiliensis* subcultivada 200 veces.

Objetivos Específicos

1. Comparar los cambios en los fenotipos metabólicos entre la cepa HUJEG-1 (P0) y su contraparte subcultivada 200 veces (P200).
2. Determinar las rutas metabólicas de *Nocardia brasiliensis* teóricamente afectadas por las deleciones sufridas durante los 200 subcultivos.
3. Trazar en qué momento de estos subcultivos se realizaron estos cambios.

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño:

Es un estudio experimental in vitro tipo descriptivo, prospectivo, longitudinal y comparativo.

Se realizó una base de datos en Excel donde se consignaron valores absolutos como resultados de la investigación.

Lugar del estudio:

Instalaciones del Laboratorio Interdisciplinario de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

Recursos biológicos:

Cepa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 aislada y tipificada de los pacientes del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, los aislamientos forman parte de la colección del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica y han sido identificados por medios moleculares mediante el uso de análisis de secuencia de nucleótidos.

Descripcion del Estudio:

OBJETIVO 1: Comparar los cambios en los fenotipos metabólicos entre la cepa P0 y su contraparte P200.

- Se analizaron los diferentes subcultivos de la cepa HUJEG-1 de *N. brasiliensis* mediante la identificación de cambios fenotípicos macroscópicos.
- Comparamos los diferentes subcultivos observando la progresión en la

metabolización de los diferentes compuestos.

1.1. Cultivo de cepas

- Se obtuvieron cepas de crioviales almacenados del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica.
- Se dejaron descongelando a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Después se tomaron 2 asadas y se inocularon en 100 ml de medio BHI en 2 matraces Erlenmeyer de 500 ml.
- Incubar en agitador a 37°C a 110 rpm hasta obtener crecimiento bacteriano durante 3 días.
- Decantar los matraces Erlenmeyer.
- Pasar la masa celular en tubos falcon de 50 ml con 20 ml de agua destilada.
- Centrifugar a 3500xg por 10 minutos, repetir 3 veces.
- Decantar y obtener la masa celular.
- Macerar masa con homogeneizador Potter-Elvehjem.
- Obtener 1 ml con pipeta e inocular en 250 ml de BHI en 2 matraces Erlenmeyer de 1000 ml.
- Incubar en agitador a 37°C a 110 rpm durante 3 días.

1.2. Crecimiento de cepas HUJEG-1 P0 y P200 en placas de microarreglos fenotípicos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM 1 – PM 4, PM11 – PM14, PM16 - PM18

A. Preparación de las soluciones aditivas de las placas de microarreglos

Preparación de aditivos: Adicionar en un frasco para reactivo a una concentración de 120x

- Preparación de 100 ml de aditivo para PM1, PM2:

- 10 ml de MgCl₂, 6.H₂O, CaCl₂, 2.H₂O
 - 10 ml de L-arginina, HCl L-glutamato, Na
 - 30 ml de L-cistina, pH8.5, 5'-UMP, 2.Na
 - 10 ml de extracto de levadura
 - 10 ml de tween 80
 - 30 ml de agua estéril
-
- Preparación de 100 ml de aditivo para PM3
 - 30 ml de ácido tricarbálico pH7.1
 - 10 ml de MgCl₂, 6.H₂O, CaCl₂, 2.H₂O
 - 30 ml de L-cistina, pH8.5, 5'-UMP, 2Na
 - 10 ml de extracto de levadura
 - 10 ml de tween 80
 - 10 ml de D-glucosa piruvato, Na
-
- Preparación de 100 ml de aditivo para PM4
 - 30 ml de ácido tricarbálico pH7.1
 - 10 ml de MgCl₂, 6.H₂O, CaCl₂, 2.H₂O
 - 10 ml de L-arginina, HCl L-glutamato, Na
 - 10 ml de extracto de levadura
 - 10 ml de tween 80
 - 10 ml de D-glucosa piruvato, Na
 - 20 ml de agua estéril
-
- Preparación de 100 ml de aditivo para PM11
 - 10 ml de MgCl₂, 6.H₂O, CaCl₂, 2.H₂O
 - 10 ml de extracto de levadura
 - 10 ml de tween 80
 - 10 ml de D-glucosa piruvato, Na

- 20 ml de agua estéril

- Preparación de 100 ml de aditivo para PM12
 - 10 ml de $MgCl_2 \cdot 6.H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2.H_2O$
 - 10 ml de extracto de levadura
 - 10 ml de tween 80
 - 10 ml de D-glucosa piruvato, Na
 - 20 ml de agua estéril

- Preparación de 100 ml de aditivo para PM13
 - 10 ml de $MgCl_2 \cdot 6.H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2.H_2O$
 - 10 ml de extracto de levadura
 - 10 ml de tween 80
 - 10 ml de D-glucosa piruvato, Na
 - 20 ml de agua estéril

- Preparación de 100 ml de aditivo para PM14
 - 10 ml de $MgCl_2 \cdot 6.H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2.H_2O$
 - 10 ml de extracto de levadura
 - 10 ml de tween 80
 - 10 ml de D-glucosa piruvato, Na
 - 20 ml de agua estéril

- Preparación de 100 ml de aditivo para PM16
 - 10 ml de $MgCl_2 \cdot 6.H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2.H_2O$
 - 10 ml de extracto de levadura
 - 10 ml de tween 80
 - 10 ml de D-glucosa piruvato, Na
 - 20 ml de agua estéril

- Preparación de 100 ml de aditivo para PM17
 - 10 ml de MgCl₂, 6.H₂O, CaCl₂, 2.H₂O
 - 10 ml de extracto de levadura
 - 10 ml de tween 80
 - 10 ml de D-glucosa piruvato, Na
 - 20 ml de agua estéril

- Preparación de 100 ml de aditivo para PM18
 - 10 ml de MgCl₂, 6.H₂O, CaCl₂, 2.H₂O
 - 10 ml de extracto de levadura
 - 10 ml de tween 80
 - 10 ml de D-glucosa piruvato, Na
 - 20 ml de agua estéril

B. Esterilizar por filtración y guardar a 4°C.

1.3 Preparación de la suspensión celular:

- A. Se ajustó una cuveta de espectrofotómetro con 20 ml de 1 x IF0a al 100% de transmitancia, la cual se utilizó como control.
- B. Agregar 1 ml de masa celular con pipeta a 19 ml de 1 x IF0a a la cuveta de espectrofotómetro y ajustar hasta obtener un 81% de transmitancia.

1.4 Preparación del medio de inoculación

- A. Medio de inoculación para PM1: adicionar 20 ml de IF-0a GN/GP (1.2x), 0.24 ml de Dye mixg (100x), 2 ml del aditivo PM 1 y 1.76 ml de suspensión celular al 81 % T.
- B. Medio de inoculación para PM2: adicionar 20 ml de IF-0a GN/GP (1.2x), 0.24 ml de Dye mixg (100x), 2 ml del aditivo PM 2 y 1.76 ml de

suspensión celular al 81 % T.

C. Medio de inoculación para PM3: adicionar 40 ml de IF-0a GN/GP (1.2x), 0.48 ml de Dye mixg (100x), 4 ml del aditivo PM 3 y 3.52 ml de suspensión celular al 81 % T.

D. Medio de inoculación para PM4: adicionar 10 ml de IF-0a GN/GP (1.2x), 0.12 ml de Dye mixg (100x), 1 ml del aditivo PM 4 y 0.88 ml de suspensión celular al 81 % T.

E. Medio de inoculación para PM11: adicionar 110 ml de IF-10b GN/GP (1.2x), 1.32 ml de Dye mixg (100x), 11 ml del aditivo PM11 – PM14, PM16 - PM18 y 9.68 ml de suspensión celular al 81 % T.

F. Medio de inoculación para PM12: adicionar 110 ml de IF-10b GN/GP (1.2x), 1.32 ml de Dye mixg (100x), 11 ml del aditivo PM11 – PM14, PM16 - PM18 y 9.68 ml de suspensión celular al 81 % T.

G. Medio de inoculación para PM13: adicionar 110 ml de IF-10b GN/GP (1.2x), 1.32 ml de Dye mixg (100x), 11 ml del aditivo PM11 – PM14, PM16 - PM18 y 9.68 ml de suspensión celular al 81 % T.

H. Medio de inoculación para PM14: adicionar 110 ml de IF-10b GN/GP (1.2x), 1.32 ml de Dye mixg (100x), 11 ml del aditivo PM11 – PM14, PM16 - PM18 y 9.68 ml de suspensión celular al 81 % T.

I. Medio de inoculación para PM16: adicionar 110 ml de IF-10b GN/GP (1.2x), 1.32 ml de Dye mixg (100x), 11 ml del aditivo PM11 – PM14, PM16 - PM18 y 9.68 ml de suspensión celular al 81 % T.

J. Medio de inoculación para PM17: adicionar 110 ml de IF-10b GN/GP (1.2x), 1.32 ml de Dye mixg (100x), 11 ml del aditivo PM11 – PM14, PM16 - PM18 y 9.68 ml de suspensión celular al 81 % T.

K. Medio de inoculación para PM18: adicionar 110 ml de IF-10b GN/GP (1.2x), 1.32 ml de Dye mixg (100x), 11 ml del aditivo PM11 – PM14, PM16 - PM18 y 9.68 ml de suspensión celular al 81 % T.

1.5 Inoculación de medios a placas de microarreglos de BIOLOG phenotype

microarrays™ PM 1 – PM 4, PM11 – PM14, PM16 - PM18

- A. Inocular 100 µL de medio de inoculación para PM1 en cada pocillo de la placa de microarreglos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM1 MicroPlate™ Carbon Sources utilizando pipeta automática (BioPette™ plus Autoclavable Pippete 20-200 µl).
- B. Inocular 100 µL de medio de inoculación para PM2 en cada pocillo de la placa de microarreglos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM2A MicroPlate™ Carbon Sources utilizando pipeta automática (BioPette™ plus Autoclavable Pippete 20-200 µl).
- C. Inocular 100 µL de medio de inoculación para PM3 en cada pocillo de la placa de microarreglos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM3B MicroPlate™ Nitrogen Sources utilizando pipeta automática (BioPette™ plus Autoclavable Pippete 20-200 µl).
- D. Inocular 100 µL de medio de inoculación para PM4A en cada pocillo de la placa de microarreglos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM4A MicroPlate™ Phosphorus and Sulfur Sources utilizando pipeta automática (BioPette™ plus Autoclavable Pippete 20-200 µl).
- E. Inocular 100 µL de medio de inoculación para PM11 en cada pocillo de la placa de microarreglos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM11 MicroPlate™ utilizando pipeta automática (BioPette™ plus Autoclavable Pippete 20-200 µl).
- F. Inocular 100 µL de medio de inoculación para PM12 en cada pocillo de la placa de microarreglos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM12 MicroPlate™ utilizando pipeta automática (BioPette™ plus Autoclavable Pippete 20-200 µl).
- G. Inocular 100 µL de medio de inoculación para PM13 en cada pocillo de la placa de microarreglos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM13 MicroPlate™ utilizando pipeta automática (BioPette™ plus Autoclavable Pippete 20-200 µl).

H. Inocular 100 μ L de medio de inoculación para PM14 en cada pocillo de la placa de microarreglos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM14 MicroPlate™ utilizando pipeta automática (BioPette™ plus Autoclavable Pippete 20-200 μ l).

I. Inocular 100 μ L de medio de inoculación para PM16 en cada pocillo de la placa de microarreglos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM16 MicroPlate™ utilizando pipeta automática (BioPette™ plus Autoclavable Pippete 20-200 μ l).

J. Inocular 100 μ L de medio de inoculación para PM17 en cada pocillo de la placa de microarreglos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM17 MicroPlate™ utilizando pipeta automática (BioPette™ plus Autoclavable Pippete 20-200 μ l).

K. Inocular 100 μ L de medio de inoculación para PM18 en cada pocillo de la placa de microarreglos (BIOLOG phenotype microarrays™) PM18 MicroPlate™ utilizando pipeta automática (BioPette™ plus Autoclavable Pippete 20-200 μ l).

1.6 Análisis de datos mediante lector de placas

A. Se realizó lectura de las placas PM1, PM2, PM3 y PM4 utilizando BioTek Synergy HT Microplate reader en 1:590 y 2:750 para P0 y P200.

B. Se analizó mediante Gen5™ software

OBJETIVO 2: Determinar que rutas metabólicas de *Nocardia brasiliensis* fueron afectadas por las deleciones sufridas durante los 200 subcultivos.

A. Se compararon los genomas de la cepa parental (P0) contra la cepa atenuada (P200) en Biocyc Genome Database.

B. Una vez identificados los compuestos con diferencias en la asimilación

entre P0 y P200, se procedió a determinar las rutas metabólicas y los genes en los cuales intervienen dichos componentes.

- C. Se localizaron dichos genes en el genoma para ver si formaban parte de las deleciones reportadas.

OBJETIVO 3: Trazar en qué momento de estos subcultivos se realizaron estos cambios.

3.1 Crecimiento de cepa HUJEG-1 P0 y P200 en medio de carbono.

A. Posterior al análisis de placas de Biolog, se tomaron los reactivos que dejaron de metabolizarse por la cepa P200 HUJEG-1.

B. Preparación de medio de asimilación de carbohidratos

Para 500 ml de medio:

1. Base nitrogenada de levadura (Difco™) 3.35 g.

- Suspender 3.35 gramos de base nitrogenada de levadura (Difco™) en 400 ml de agua destilada, mezclar hasta que se disuelva el medio.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente.

2. Carbohidrato seleccionado 2.5 g.

- Suspender 2.5 g de carbohidrato seleccionado en 100 ml de agua destilada.
- Esterilizar por filtración.

Agregar 100 ml de solución carbohidratada estéril a 400 ml de base nitrogenada de levadura. Concentración final de carbohidrato al 0.5%.

Preparar tubos de 2 ml de medio en medios asépticos.

1. **Inoculación de cepa HUJEG-1 P0 y P200 en medio de asimilación de carbohidratos.** Se cultivará HUJEG-1 P0 y P200 en medio de cultivo BHI, se dejará crecer durante 3 días en incubadora a 35°C.
2. Se tomará una asada de cada cultivo HUJEG-1 P0 y P200 de BHI y se inoculará en tubos de medio de asimilación de carbohidratos.
3. Se dejará en incubadora a 35°C durante 3 días.

3.2 Crecimiento de subcultivos en medio de carbono

A. Preparación de medio de asimilación de carbohidratos

Para 500 ml de medio:

1. Base nitrogenada de levadura (Difco™) 3.35 g.
 - Suspender 3.35 gramos de base nitrogenada de levadura (Difco™) en 400 ml de agua destilada, mezclar hasta que se disuelva el medio.
 - Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
 - Dejar enfriar a temperatura ambiente.
2. Carbohidrato seleccionado 2.5 g.
 - Suspender 2.5 g de carbohidrato seleccionado en 100 ml de agua destilada
 - Esterilizar por filtración

Agregar 100 ml de solución carbohidratada estéril a 400 ml de base nitrogenada de levadura. Concentración final de carbohidrato al 0.5%

Preparar tubos de 2 ml de medio en medios asépticos.

Inoculación de subcultivos HUJEG-1 P0 a P200 en medio de asimilación de carbohidratos.

1. Se cultivó HUJEG-1 P0 y P200 en medio de BHI, se dejará crecer durante 3 días en incubadora a 35°C.
2. Se tomará una asada de cada subcultivo HUJEG-1 de BHI y se inoculó en tubos de medio de asimilación de carbohidratos.
3. Se dejó en incubadora a 35°C durante 3 días.
4. Se observó en cuales medios de asimilación presentan crecimiento bacteriano.

Subcultivos

Posteriormente se repitió el proceso de medio de asimilación de carbohidratos con los componentes identificados previamente para P0 y P200; cada 10 subcultivos para observar el momento exacto de la pérdida de asimilación de cada compuesto.

Análisis de resultados

Se realizó un base de datos en Excel, donde se consignaron valores absolutos como resultados (Ej. Si presenta crecimiento bacteriano en el medio con el compuesto para el cual fue probada dicho subcultivo de la bacteria) y las diferencias génicas absolutas de la cepa original (P0) y la atenuada mediante subcultivos (P200).

Nota: La metodología se realizó cuando menos en duplicado. Es este trabajo no se utilizarán sujetos humanos o animales, ni se hicieron uso de sus datos clínicos.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

Cambios fenotípicos:

Se observaron cambios fenotípicos en al menos un reactivo en las placas PM01, PM03, PM04, PM06, PM07, PM11, PM12, PM14, PM16, PM17 y PM18. Dichos cambios se establecen como presencia de asimilación del compuesto por P0 y ausencia de asimilación de P200, los cuales pueden observarse en rojo (ver figura 1 y anexo 1). Dichos cambios se observan a partir de P150 para β glicerol fosfato y guanina, a partir de P170 para tween 80 y D-treonina, y a partir de P180 en tween 20 y tween 40 (ver figura 2, figura 3 y figuras 9-13 en anexo 2).

Placa BIOLOG	Micropocillo	P0	P200	Compuesto
PM01	C05			tween 20
PM01	D05			tween 40
PM01	E05			tween 80
PM01	F04			D-treonina
PM03	F06			guanina
PM04	B04			β -Glicerol fosfato
PM04	H03			1-tio- β -D-glucosa
PM11	E04			cefazolina
PM12	C08			vancomicina
PM12	D09			novobiocina
PM12	F07			sulfatiazol
PM12	F08			sulfatiazol
PM12	G07			sulfametoxazol
PM12	G08			sulfametoxazol
PM14	B03			9-aminoacridina
PM16	A10			5-cloro-7-iodo- 8-hidroxi-quinolina
PM16	B08			sulfanilamida
PM16	E04			estreptomina
PM17	B01			salicilato de sodio
PM17	B07			hygromicina B
PM18	H11			plumbagina

Figura 1. Compuestos en los que se observaron cambios entre P0 vs. P200. En verde se encuentran los compuestos que fueron metabolizados por P0 y en rojo los que no se asimilaron por P200.

	tween 20	tween 40	tween 80	D-treonina	β -glicerol fosfato	guanina
P0	+++	+++	++	+++	+++	+++
P140a	+++	+++	++	+++	+++	+++
P150a	++	++	++	++	+	+
P160a	++	++	++	++	+	+
P170a	++	++	+	+	+	+
P180a	+	+	+	+	+	+
P190a	+	+	+	+	+	+
P200a	+	+	+	+	+	+

Figura 2. Ensayo de fenotipos por subcultivos, donde se coloca con (+) un crecimiento bacteriano leve, (++) crecimiento bacteriano moderado y (+++) crecimiento bacteriano alto. En azul se muestra el cambio de turbidez entre los diferentes subcultivos. En la primera columna se encuentran enlistados los subcultivos de *N. brasiliensis* y en la primera fila se encuentran los compuestos probados.

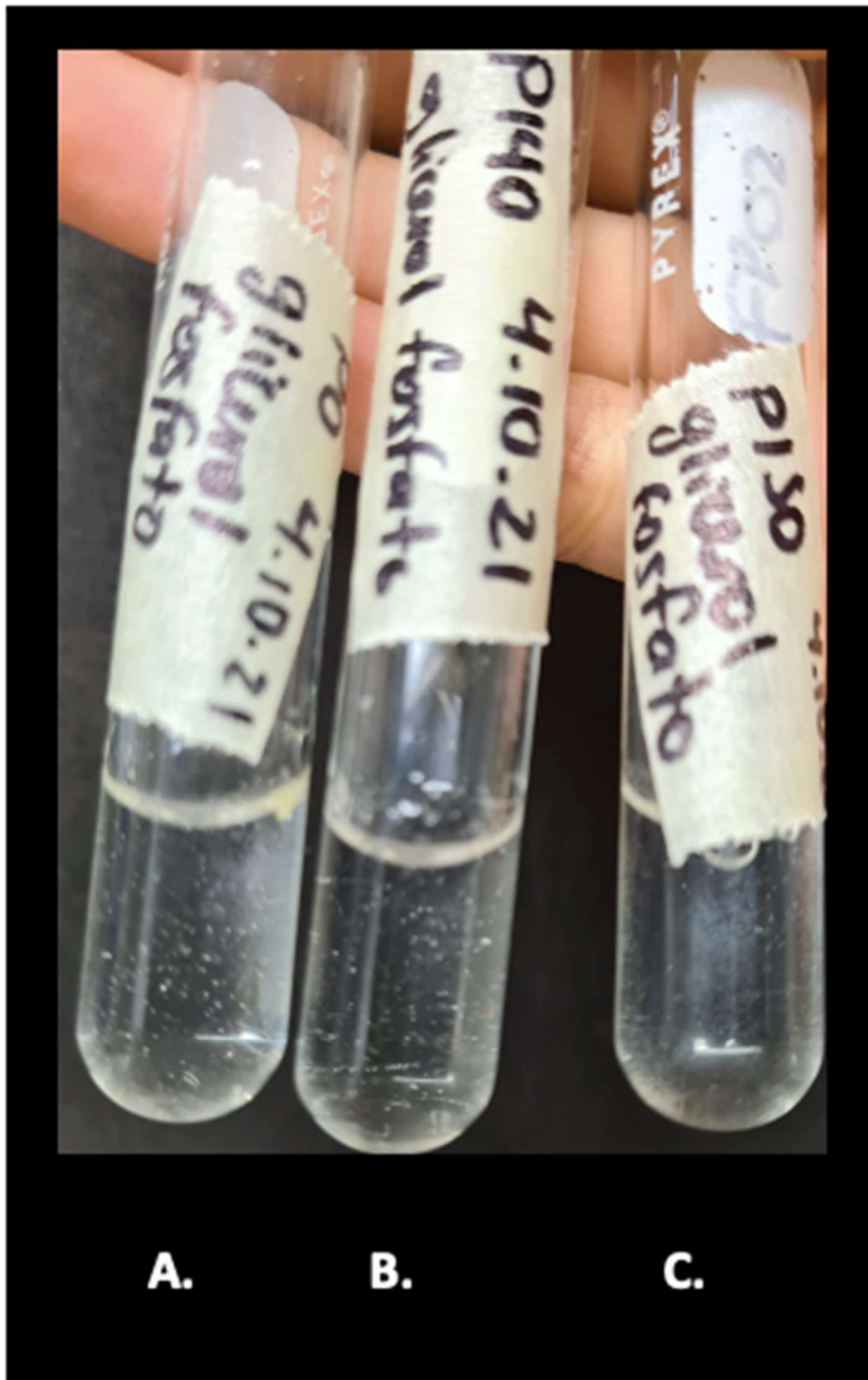


Figura 3. Reactivo de glicerol fosfato en P0 (A), P140 (B) y P150 (C), donde se compara el crecimiento con la turbidez de mayor a menor en los tubos de ensayo. P0 (+++), P140 (++) y P170 (+).

Análisis de las posibles rutas metabólicas involucradas:

Posterior a los 200 subcultivos de la cepa *N. brasiliensis* realizados en BHI, se buscó detectar cambios genéticos en P200, por lo que se analizó el ADN reportado en Biocyc Genome Database. Donde se reportaron 3 deleciones de familias de genes importantes denominadas: RDNb1, RDNb2 y RDNb3 que colectivamente resultaron en la pérdida de 265 genes. RDNb2, es donde se encuentran las deleciones de las vías metabólicas que se describen a continuación, comprende una pérdida de 216, 371 pb en donde se encuentran 172 genes y su secuencia corresponde a la región del nucleótido 4;795,938 al 5;012,299-pb en el genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 ATCC 700358 (Número de acceso: NC_018681.1) (ver Figura 4).(10)

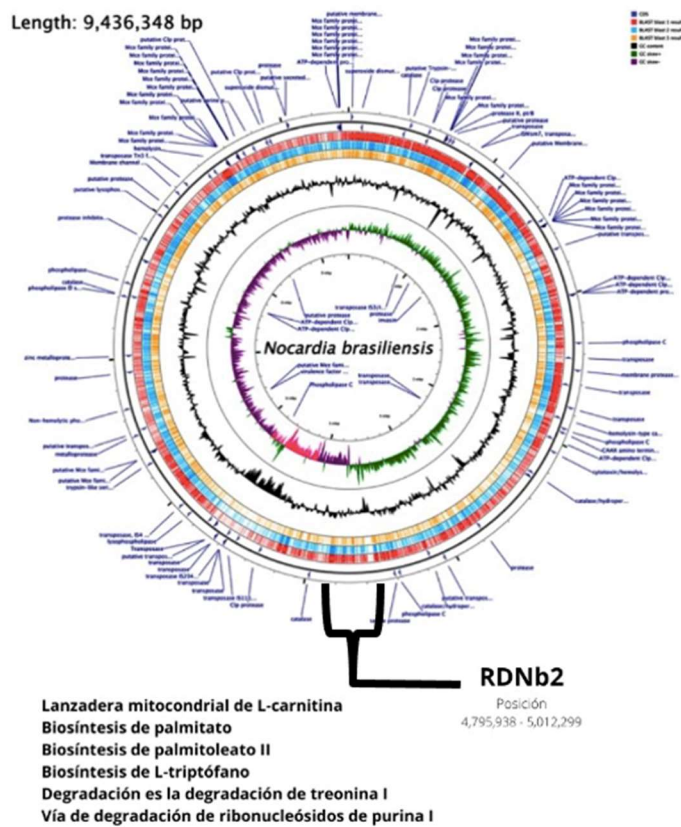


Figura 4. Ubicación de la delección RDNb2, dentro de las cuales se encuentran las rutas metabólicas afectadas, en el genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1.

Al analizar su posición en el genoma se encontró que las rutas afectadas mediante los cambios fenotípicos son parte de RDNb2, que fue pérdida durante los 200 subcultivos, de acuerdo a Campos-Rivera, 2012.(10)

Cambios genotípicos en tween 20 (polisorbato 20)

El tween 20 y otros compuestos de este tipo de polisorbato, como el tween 40 y tween 80, se metabolizan consumiendo su larga cadena de carbonos utilizando la vía de la L-carnitina y β oxidación.(11,12) En la figura 5 mostramos la ruta de la L-carnitina. Al analizar los genes ortólogos en el genoma de *N. brasiliensis* involucrados en esta ruta, encontramos la siguiente lista de genes en la tabla 1.

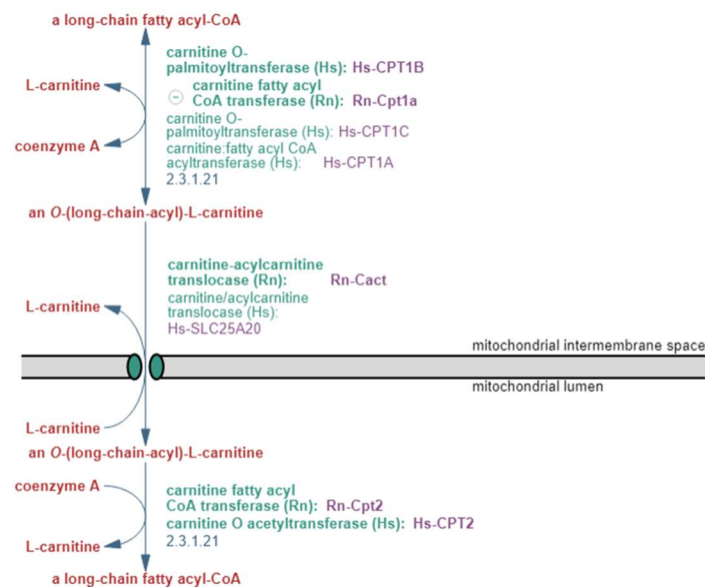


Figura 5. Ruta metabólica del sistema celular de la L-carnitina.

El tween 20 es parte del sistema celular de L-carnitina, pues se encuentra involucrado en la vía de la lanzadera mitocondrial de L-carnitina, la cual facilita el transporte de ácidos grasos al lumen.(11,12)

Tween 20 (polisorbato 20)	CPT1B G66-37885
	CTP 1AHS03286
	CTP1CHS09892
	CTP1BbG66-37885
	CactG-11019
	Cpt1a G-11015
	Cpt2 G-11017
	CTP2 HS08187

Tabla 1. Genes perdidos de tween 20 comprendidos en RDNb2.

Cambios genotípicos en tween 40 (ácido palmítico):

El tween 40 se encuentra involucrado en la biosíntesis de palmitato (sintasa de ácidos grasos tipo II), el cual forma parte de los determinantes en la comunicación intracelular en forma de segundos mensajeros lipídicos.(13) La pérdida de genes de dicha ruta se muestra en la tabla 2. La ruta metabólica se observa en la figura 6.

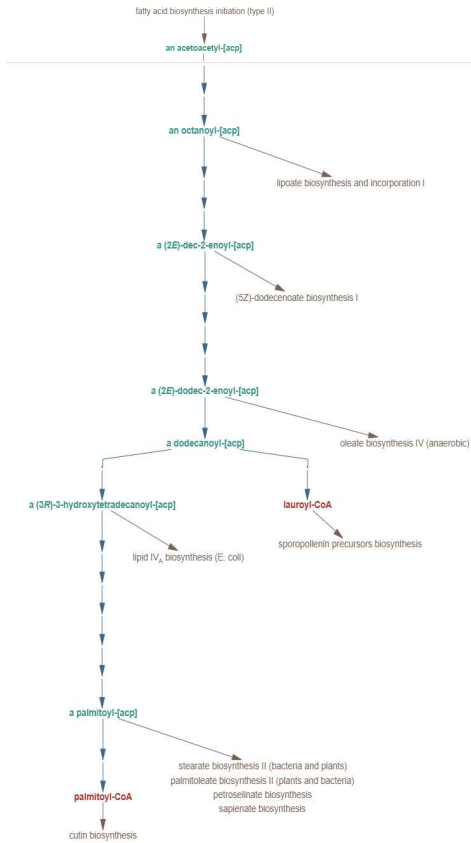


Figura 6. Ruta metabólica de la biosíntesis de palmitato.

Tween 40 (ácido palmítico)	O3I_RS07235	O3I_RS07565
	O3I_007150	O3I_007465
	O3I_RS07240	O3I_RS07570
	O3I_007155	O3I_007470
	O3I_RS07240	O3I_RS07575
	O3I_007155	O3I_007475
	O3I_RS07540	O3I_RS04110
	O3I_007440	O3I_004050
	O3I_RS07545	O3I_RS04115
	O3I_007445	O3I_004055
O3I_RS07550	O3I_RS07220	

	O3I_007450	O3I_007135
	O3I_RS07555	O3I_RS07225
	O3I_007455	O3I_007140
	fabG O3I_RS07560	O3I_RS07230
	O3I_RS07560	O3I_007145
	O3I_007460	

Tabla 2. Genes perdidos de tween 40 localizados en RDNb2.

Cambios genotípicos en tween 80 (ácido oléico):

El tween 80 se encuentra involucrado en la biosíntesis de palmitoleato II, que actúa formando parte de la estructura de los lípidos.(14) Los genes perdidos en esta ruta se observan la tabla 3. La ruta metabólica se observa en la figura 7.

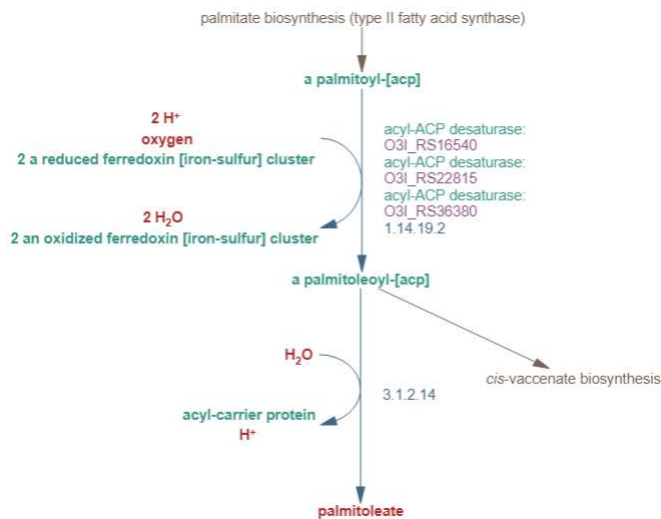


Figura 7. Ruta metabólica de la biosíntesis de palmitoleato II.

Tween	O3I_RS16540
80 (ácido)	O3I_RS16560

oléico)	O3I_RS16545
	O3I_RS16565
	O3I_RS16550
	O3I_RS16570
	O3I_RS16555
	O3I_RS16575
	O3I_RS16560
	O3I_RS16580

Tabla 3. Genes perdidos de tween 80 localizados en RDNb2.

Cambios genotípicos en β glicerol fosfato:

El β glicerol fosfato se encuentra involucrado en la biosíntesis de L-triptófano, el cual sirve para la síntesis de ADN, proteínas, además de la formación de tabiques de la membrana citoplasmática.(15) La ruta metabólica se observa en la figura 8. Los genes contenidos en el segmento RDNb2 perdidos asociados a esta ruta metabólica se incluyen en la tabla 4.

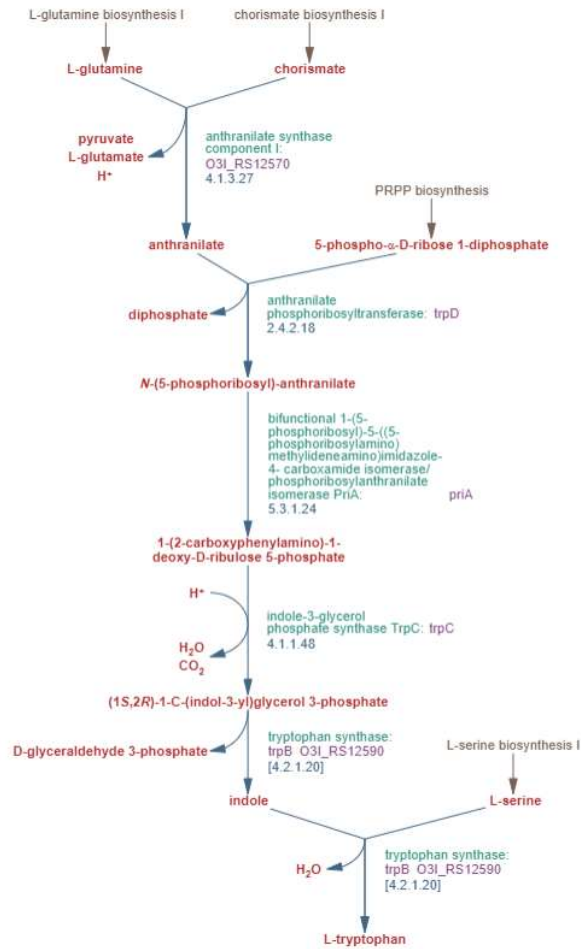


Figura 8. Ruta metabólica de la biosíntesis de L-triptófano.

Glicerol fosfato síntesis de L-triptófano	trpD O3I_RS11660	O3I_RS12550	O3I_012355	O3I_RS12575
	O3I_RS11660	O3I_012380	O3I_RS12530	O3I_012405
	O3I_011485	O3I_RS12555	O3I_012360	trpC O3I_RS12580
	priA O3I_RS12515	O3I_012385	O3I_RS12535	O3I_RS12580
	O3I_RS12515	O3I_RS12560	O3I_012365	O3I_012410
	O3I_012345	O3I_012390	O3I_RS12540	trpB

				O3I_RS12585
	O3I_RS12520	O3I_RS12565	O3I_012370	O3I_RS12585
	O3I_012350	O3I_012395	hisI O3I_RS12545	O3I_012415
	his O3I_RS12525	O3I_RS12570	O3I_RS12545	O3I_RS12590
	O3I_RS12525	O3I_012400	O3I_012375	O3I_012420

Tabla 4. Genes perdidos del glicerol localizados en RDNb2.

Cambios genotípicos en D-treonina:

La D-treonina es un aminoácido indispensable y la vía involucrada en su degradación es la ruta metabólica I de degradación de treonina, permitiendo su utilización para generar ATP como fuente de energía.(16) Los genes perdidos en esta ruta se muestran en tabla 5. La ruta metabólica se observa en la figura 9.

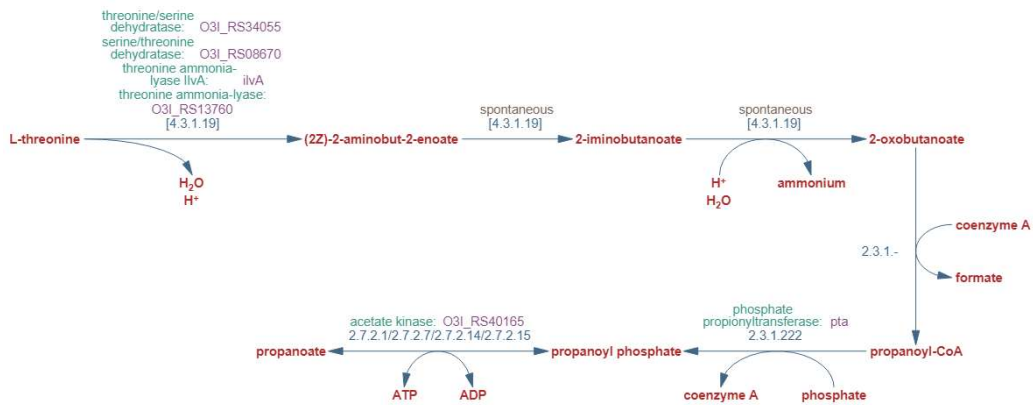


Figura 9. Ruta metabólica de la degradación de D-treonina.

D-treonina	O3I-RS08670
Degradación	O3I_008555

de treonina I	ilvA
	O3I_RS12165
	O3I_RS12165
	O3I_011990
	O3I_RS13760
	O3I_013590
	O3I_RS40165
O3I_040060	

Tabla 5. Genes perdidos de D-treonina localizados en RDNb2.

Cambios genotípicos en guanina:

La vía involucrada en este gen, es la vía de degradación de ribonucleósidos de purina I, que pueden servir como fuentes de energía o de nitrógeno.(17) La pérdida de material genético en esta ruta se muestra en tabla 6. La ruta metabólica se observa en la figura 10.

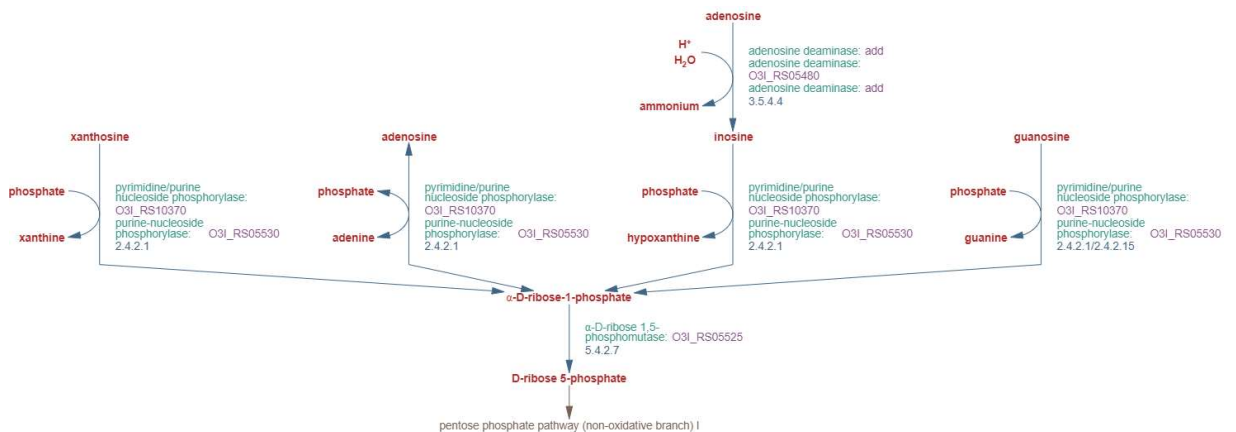


Tabla 10. Ruta metabólica de la vía de degradación de ribonucleósidos de purina I.

Guanina degradación de ribonucleósidos de purina	O3I_RS05480	O3I_RS05510
	O3I_005415	O3I_005445
	O3I_RS05485	upp O3I_RS05515
	O3I_005420	O3I_RS05515
	O3I_RS05490	O3I_005450
	O3I_005425	O3I_RS05520
	O3I_RS05495	O3I_005455
	O3I_005430	O3I_RS05525
	O3I_RS05500	O3I_005460
	O3I_005435	O3I_RS05530
	O3I_RS05505	O3I_005465
	O3I_005440	O3I_RS10370

Tabla 6. Genes perdidos de guanina localizados en RDNb2.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

Subcultivo y deleciones en P200

El subcultivo de cepas implica la repetición de pases en serie de una cepa parental o virulenta in vitro o en animales de laboratorio y se ha utilizado para estudiar el momento y el modo de evolución de los cambios genéticos en todo el genoma de estas.(18) Asimismo, se ha utilizado para producir cepas atenuadas de organismos patógenos. Los organismos cultivados deben mantenerse continuamente durante muchas generaciones para identificar con éxito si han perdido su patogenicidad.(19)

En el presente estudio se estudiaron los efectos de 200 subcultivos continuos en una cepa de *N. brasiliensis*. La cepa no subcultivada, es decir, la cepa parental, la cual es capaz de causar micetoma en ratones, se comparó con la P200, la cual no es capaz de esto.

Para el microorganismo *N. brasiliensis* HUJEG-1, tomó aproximadamente 5 años alcanzar 200 subcultivos. Para otros organismos, como *Escherichia coli* y *Mycobacterium bovis*, tomó más tiempo.(20,21)

Las 3 deleciones de P200 han sido reportadas por Campos-Rivera, 2012.(10) Estas 3 deleciones fueron de familias de genes importantes denominadas: RDNb1, RDNb2 y RDNb3 que colectivamente resultaron en la pérdida de 265 genes. La deleción de RDNb1 consta de 59, 711 pares de bases e incluye 61 genes y corresponde a la secuencia del contig 25 de la secuencia de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 0. Este contig no se ubica dentro del ensamblaje

del genoma de *N. brasiliensis*, por lo cual se considera ADN extra cromosómico. RDNb2 comprende una pérdida de 216, 371 pb en donde se encuentran 172 genes y su secuencia corresponde a la región del nucleótido 4;795,938 al 5;012,299-pb en el genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 ATCC 700358 (Número de acceso: NC_018681.1). RDNb3 corresponde a una región de 31, 711 pares de bases que comprende 32 genes y su secuencia abarca del nucleótido 1;501,900 al 1;533,611-pb del genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (Número de acceso: NC_018681.1).(10)

Cambios fenotípicos de P200

El sistema celular de L-carnitina facilita el transporte de ácidos grasos al lumen para la producción de energía mediante la β -oxidación mediante la vía de la lanzadera mitocondrial de L-carnitina. La enzima carnitina palmitoiltransferasa 1a limita la velocidad de la β -oxidación, por lo que es un paso regulador clave para la β -oxidación de los ácidos grasos debido a su sensibilidad a la inhibición por la malonil-CoA producida durante la biosíntesis de los ácidos grasos. El tween 20 se encuentra involucrado en dicha cadena.(11)

El palmitato es uno de los ácidos grasos saturados celulares más comunes, siendo componente clave de los fosfolípidos de membranas celulares, esenciales en la comunicación intracelular como segundos mensajeros lipídicos.(12)

El tween 40 se encuentra involucrado en la biosíntesis de palmitato, con la enzima sintasa de ácidos grasos tipo II, el cual forma parte de los determinantes en la comunicación intracelular en forma de segundos mensajeros lipídicos. La disminución de la síntesis de dicho ácido graso dificulta la señalización de la célula y por ende su entorno con el exterior.(13)

El palmitoleato es un ácido graso insaturado común derivado de palmitoil sintetizado mediante la enzima desaturasa, que actúa sobre los ácidos grasos incrustados en la estructura de los lípidos. Las enzimas desaturasas no actúan sobre un sustrato ácido libre. Se conocen tres tipos de desaturasas, que actúan sobre acil-CoA, acil-[acp] y conjugados acil-lípidos, respectivamente. En muchas bacterias y algunas plantas el palmitoleato se deriva de un palmitoil-[acp]. La pérdida de genes de tween 80 disminuye por ende la biosíntesis de palmitoleato II.(14)

Es posible que la delección de genes relacionados al sistema celular de β -oxidación tenga efecto en la síntesis de ácidos grasos y nocardiomicólicos, que componen gran parte de la pared celular de la bacteria, lo que podría devenir en un pared más débil y susceptible a la destrucción por lo fagocitos. Esto apoyaría el cambio en la forma y tasa de crecimiento de P200, ya no en forma de filamentos o grumos como P0, sino en forma de suspensión principalmente unicelular o de fragmentos. Asimismo, podría estar asociado a la pérdida de la ácido-alcohol reistencia, como se ha visto en *Mycobacterium tuberculosis* con la pérdida de *kasB*, un gen importante en la síntesis de ácidos grasos y micólicos.(22)

Cambios en β glicerol fosfato

El triptófano actúa de manera intracelular mediante inhibición de síntesis de ADN y proteínas, además de alteración de formación del tabique de la membrana citoplasmática. Ya que el β glicerol fosfato se encuentra involucrado en la biosíntesis de L-triptófano, la delección de estos genes disminuye la regulación de la síntesis de proteínas en la P200.(15)

Cambios en D-treonina

La D-treonina es un aminoácido indispensable, pues participa en la

degradación de treonina a propionato generando ATP, permitiendo a la bacteria a usar la treonina como fuente de carbono y energía. Las bacterias tienen dos tipos de treonina deshidratasa: su forma catabólica y la enzima biosintética, ambas deshidratan la D-treonina. La enzima biosintética participa en la biosíntesis de L-isoleucina y la forma catabólica participa en la degradación de treonina a propionato en una vía que genera ATP, y permite a la bacteria utilizarlo como fuente de carbono. Sin embargo, los genes perdidos codificaban para la vía I de degradación de D-treonina privando así a la bacteria del uso eficiente de ATP.(16)

Cambios en guanina

Los ribonucleósidos de purina pueden ser utilizados como fuentes de carbono y energía. Los nitrógenos aminados de la adenosina y la guanina, generados como subproducto de esta vía, pueden servir como fuente de nitrógeno total para algunas bacterias. La vía de degradación de ribonucleósidos de purina se cree estar alterada en P200 debido a la delección de genes relacionados a esta misma, ocasionando así un menor aporte de nitrógeno para la bacteria.(17)

Antimicrobianos

N. brasiliensis HUGEG-1 posee muchos transportadores ABC (ATP-binding cassette) que facilitan la eliminación de compuestos tóxicos los cuales incluyen partículas antimicrobianas y sus metabolitos. Además de poseer 29 copias de β -lactamasas en su genoma, estas copias extra de los genes podrían explicar algunos de los mecanismos de resistencia de la bacteria. También se han encontrado copias de *gyrA b*, *gyrB* y *rpoB* que se asocian a la resistencia a quinolonas y rifampicina. Este estudio demostró que P200 es sensible a cefazolina, vancomicina, novobiocina, sulfatiazol, sulfametoxazol, 9-

aminoacridina, 5-Chloro-7-iodo-8-hydroxy-quinolina, sulfanilamida, estreptomycin, salicilato de sodio, higromicina B, plumbagina en las placas, cuando originalmente era resistente en su forma parental (P0). Esto podría explicarse por la pérdida de material hidrofóbico afectado por los genes involucrados en la β oxidación (como se explicó anteriormente). Una pared celular menos densa, sería mas permeable incrementandose la susceptibilidad a este tipo de antimicrobianos, particularmente los β lactámicos.(7)

Dentro de las limitaciones, vale la pena mencionar que no contamos con pruebas genéticas de las rutas metabólicas perdidas, solamente el fenotipo. Además, dichos resultados no son absolutos, si no una disminución de la asimilacion. Asimismo, no se pudieron realizar curvas de crecimiento con los reactivos debido a que no se contaba con el equipo adecuado.

Al analizar los subcultivos, no teníamos aquellos de 135 a 200, por lo que volvimos a subcultivar la cepa, que aunque también es atenuada para los ratones BALB/c, aunque no es exactamente la misma P200.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIÓN

1. La cepa de *N. brasiliensis* sometida a 200 subcultivos, P200, presentó, aparte de deleciones genéticas importantes ya observadas, diferencias metabólicas con respecto a la cepa original (P0).

3. P200 ha mostrado haber perdido capacidad de asimilación de los compuestos tween 20, tween 40, tween 80, importantes para la síntesis de las lípidos de la pared celular, lo cual podría ser la causa de sus cambios físicos y de virulencia.

3. P200 es más sensible a diversos antimicrobianos debido a la pérdida en la estructura de la pared celular hidrofóbica que impedía la entrada de los mismos.

CAPÍTULO X

BIBLIOGRAFÍA

1. Welsh O, Vera-Cabrera L, Dermatology MS-C-C in, 2007 U. Mycetoma. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Dec 9]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X06000708>
2. Hay R, Mahgoub E, ... GL-J of M and, 1992 U. Mycetoma. Taylor Fr [Internet]. [cited 2021 Dec 9]; Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/02681219280000751>
3. Lichon V, Khachemoune A. Mycetoma: a review. Vol. 7, American Journal of Clinical Dermatology. 2006. p. 315–21.
4. Hay RJ, Mahgoub ES, Leon G, Al-Sogair S, Welsh O. Mycetoma. Med Mycol. 1992;30(S1):41–9.
5. Palestine RF, Rogers RS. Diagnosis and treatment of mycetoma. J Am Acad Dermatol [Internet]. 1982 Jan;6(1):107–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019096228270009X>
6. Welsh O, Saucedo E, Gonzalez J, Ocampo J. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. J Am Acad Dermatol [Internet]. 1987 Sep;17(3):443–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962287702278>
7. Vera-Cabrera L, Ortiz-Lopez R, Elizondo-Gonzalez R, Ocampo-

- Candiani J. Complete Genome Sequence Analysis of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 Reveals a Saprobic Lifestyle and the Genes Needed for Human Pathogenesis. Gordon S V., editor. PLoS One [Internet]. 2013 Jun 3;8(6):e65425. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0065425>
8. Almaguer-Chávez JA, Welsh O, Lozano-Garza HG, Said-Fernández S, Romero-Díaz VJ, Ocampo-Candiani J, et al. Decrease of virulence for BALB/c mice produced by continuous subculturing of *Nocardia brasiliensis*. BMC Infect Dis [Internet]. 2011 Dec 26;11(1):290. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-11-290>
 9. Calmette A, Guerin C. Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux d'origine, cultivé sur la bile de boeuf glycéinée. C R Acad Sci. 1909;(149):716–8.
 10. Campos-Rivera MP. Caracterización genética de una cepa atenuada de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. Tesis Maest. 2012;
 11. Longo N, Frigeni M, Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet]. 2016 Oct;1863(10):2422–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488916300131>
 12. Casares D, Escribá P V., Rosselló CA. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 May 1;20(9):2167. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2167>

13. Bishop RE, Gibbons HS, Guina T, Trent MS, Miller SI, Raetz CRH. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of Gram-negative bacteria. *EMBO J*. 2000;19(19):5071–80.
14. Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis. *Plant Cell*. 1995;7(7):957–70.
15. Vancauwenberge JE, Slininger PJ, Bothast RJ. Bacterial conversion of glycerol to β -hydroxypropionaldehyde. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56(2):329–32.
16. Egan RM, Phillips AT. Requirements for induction of the biodegradative threonine dehydratase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1977;132(2):370–6.
17. Mathews CK. Nucleotides, Nucleosides, And Nucleobases. *Encycl Mol Biol*. 2002;
18. Ebert D. Experimental evolution of parasites. *Science* (80-). 1998;282(5393):1432–5.
19. Martin C, Walker B. Attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex for laboratory and clinical use. *Tuberculosis*. 2008;88(5):371–4.
20. Kozak RA, Alexander DC, Liao R, Sherman DR, Behr MA. Region of difference 2 contributes to virulence of *mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2011;79(1):59–66.
21. Barrick JE, Yu DS, Yoon SH, Jeong H, Oh TK, Schneider D, et al. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* [Internet]. 2009 Oct 18;461(7268):1243–7. Available from:

<http://www.nature.com/articles/nature08480>

22. Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, Gurcha SS, Kremer L, Chen B, et al. Deletion of kasB in Mycobacterium tuberculosis causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2007 Mar 20;104(12):5157–62. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0608654104>

CAPÍTULO XI

ANEXOS

Anexo 1. A continuación se muestran las tablas de las placas PM1-PM4, PM11-PM14, PM16-PM18 de BIOLOG, donde pueden observarse los cambios fenotípicos mediante 1,056 compuestos. Estos se establecen como ausencia de la asimilación del compuesto por parte de P200 en rojo. En azul se muestran los reactivos que no fueron asimilados por P0 ni P200. Finalmente, en naranja se encuentran los metabolitos que fueron asimilados por ambas cepas.

PM01 MicroPlate Carbon Sources			
	P0	P200	
A01			Negative Control
A02			L-Arabinose
A03			N-Acetyl-D-Glucosamine
A04			D-Saccharic Acid
A05			Succinic Acid
A06			D-Galactose
A07			L-Aspartic Acid
A08			L-Proline
A09			D-Alanine
A10			D-Trehalose
A11			D-Mannose
A12			Dulcitol
B01			D-Serine
B02			D-Sorbitol
B03			Glycerol
B04			L-Fucose
B05			D-Glucuronic Acid
B06			D-Gluconic Acid
B07			D, L-a-Glycerol-Phosphate
B08			D-Xylose
B09			L-Lactic Acid
B10			Formic Acid
B11			D-Mannitol
B12			L-Glutamic Acid
C01			D-Glucose-6-Phosphate
C02			D-Galactonic Acid-γ-Lactone
C03			D,L-Malic Acid
C04			D-Ribose
C05			Tween 20
C06			L-Rhamnose
C07			D-Fructose
C08			Acetic Acid
C09			α-D-Glucose
C10			Maltose
C11			D-Melibiose
C12			Thymidine
D01			L-Asparagine
D02			D-Aspartic Acid
D03			D-Glucosaminic Acid
D04			1,2-Propanediol
D05			Tween 40
D06			α-Keto-Glutaric Acid
D07			α-Keto-Butyric Acid
D08			α-Methyl-D- Galactoside
D09			α-D-Lactose
D10			Lactulose
D11			Sucrose
D12			Uridine
E01			L-Glutamine
E02			m-Tartaric Acid
E03			D-Glucose-1- Phosphate
E04			D-Fructose-6- Phosphate
E05			Tween 80
E06			α-Hydroxy Glutaric Acid-γ- Lactone
E07			α-Hydroxy Butyric Acid
E08			β-Methyl-D- Glucoside
E09			Adonitol
E10			Maltotriose
E11			2-Deoxy Adenosine
E12			Adenosine
F01			Glycyl-L-Aspartic Acid
F02			Citric Acid
F03			myo-Inositol
F04			D-Threonine
F05			Fumaric Acid
F06			Bromo Succinic Acid
F07			Propionic Acid
F08			Mucic Acid
F09			Glycolic Acid
F10			Glyoxylic Acid
F11			D-Cellobiose
F12			Inosine
G01			Glycyl-L- Glutamic Acid
G02			Tricarballic Acid
G03			L-Serine
G04			L-Threonine
G05			L-Alanine
G06			L-Alanyl-Glycine
G07			Acetoacetic Acid
G08			N-Acetyl-β-D- Mannosamine
G09			Mono Methyl Succinate
G10			Methyl Piruvato
G11			D-Malic Acid
G12			L-Malic Acid
H01			Glycyl-L-Proline
H02			p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid
H03			m-Hydroxy Phenyl Acetic Acid
H04			Tyramine
H05			D-Psicose
H06			L-Lyxose
H07			Glucuronamide
H08			Pyruvic Acid
H09			L-Galactonic Acid-γ-Lactone
H10			D-Galacturonic Acid
H11			Phenylethyl- amine
H12			2-Aminoethanol

PM02 MicroPlate Carbon Sources			
	P0	P200	
A01			Negative Control
A02			Chondroitin Sulfate C
A03			α -Cyclodextrin
A04			β -Cyclodextrin
A05			γ -Cyclodextrin
A06			Dextrin
A07			Gelatin
A08			Glycogen
A09			Inulin
A10			Laminarin
A11			Mannan
A12			Pectin
B01			N-Acetyl-D- Galactosamine
B02			N-Acetyl- Neuraminic Acid
B03			β -D-Allose
B04			Amygdalin
B05			D-Arabinose
B06			D-Arabitol
B07			L-Arabitol
B08			Arbutin
B09			2-Deoxy-D- Ribose
B10			i-Erythritol
B11			D-Fucose
B12			3-0- β -D-Galactopyranosyl-D-Arabinose
C01			Gentiobiose
C02			L-Glucose
C03			Lactitol
C04			D-Melezitose
C05			Maltitol
C06			α -Methyl-D- Glucoside
C07			β -Methyl-D- Galactoside
C08			3-Methyl Glucose
C09			β -Methyl-D- Glucuronic Acid
C10			α -Methyl-D- Mannoside
C11			β -Methyl-D- Xyloside
C12			Palatinose
D01			D-Raffinose
D02			Salicin
D03			Sedoheptulosan
D04			L-Sorbose
D05			Stachyose
D06			D-Tagatose
D07			Turanose
D08			Xylitol
D09			N-Acetyl-D- Glucosaminitol
D10			γ -Amino Butyric Acid
D11			δ -Amino Valeric Acid
D12			Butyric Acid
E01			Capric Acid
E02			Caproic Acid
E03			Citraconic Acid
E04			Citramalic Acid
E05			D-Glucosamine
E06			2-Hydroxy Benzoic Acid
E07			4-Hydroxy Benzoic Acid
E08			β -Hydroxy Butyric Acid
E09			Glycolic Acid
E10			α -Keto-Valeric Acid
E11			Itaconic Acid
E12			5-Keto-D- Gluconic Acid
F01			D-Lactic Acid Methyl Ester
F02			Malonic Acid
F03			Melibionc Acid
F04			Oxalic Acid
F05			Oxalomalic Acid
F06			Quinic Acid
F07			D-Ribono-1,4- Lactone
F08			Sebacic Acid
F09			Sorbic Acid
F10			Succinamic Acid
F11			D-Tartaric Acid
F12			L-Tartaric Acid
G01			Acetamide
G02			L-Alaninamide
G03			N-Acetyl-L- Glutamic Acid
G04			L-Arginine
G05			Glycine
G06			L-Histidine
G07			L-Homoserine
G08			Hydroxy-L-Proline
G09			L-Isoleucine
G10			L-Leucine
G11			L-Lysine
G12			L-Methionine
H01			L-Ornithine
H02			L-Phenylalanine
H03			L-Pyroglytamic Acid
H04			L-Valine
H05			D,L-Carnitine
H06			Sec-Butylamine
H07			D,L-Octopamine
H08			Putrescine
H09			Dihydroxy Acetone
H10			2,3-Butanediol
H11			2,3-Butanedione
H12			3-Hydroxy-2- Butanone

PM03 MicroPlate Carbon Sources			
	P0	P200	
A01			Negative Control
A02			Ammonia
A03			Nitrite
A04			Nitrate
A05			Urea
A06			Biuret
A07			L-Alanine
A08			L-Arginine
A09			L-Asparagine
A10			L-Aspartic Acid
A11			L-Cysteine
A12			L-Glutamic Acid
B01			L-Glutamine
B02			Glycine
B03			L-Histidine
B04			L-Isoleucine
B05			L-Leucine
B06			L-Lysine
B07			L-Methionine
B08			L-Phenylalanine
B09			L-Proline
B10			L-Serine
B11			L-Threonine
B12			L-Tryptophan
C01			L-Tyrosine
C02			L-Valine
C03			D-Alanine
C04			D-Asparagine
C05			D-Aspartic Acid
C06			D-Glutamic Acid
C07			D-Lysine
C08			D-Serine
C09			D-Valine
C10			L-Citrulline
C11			L-Homoserine
C12			L-Ornithine
D01			N-Acetyl-L- Glutamic Acid
D02			N-Phthaloyl-L- Glutamic Acid
D03			L-Pyroglutamic Acid
D04			Hydroxylamine
D05			Methylamine
D06			N-Amylamine
D07			N-Butylamine
D08			Ethylamine
D09			Ethanolamine
D10			Ethylenediamine
D11			Putrescine
D12			Agmatine
E01			Histamine
E02			β -Phenylethyl- amine
E03			Tyramine
E04			Acetamide
E05			Formamide
E06			Glucuronamide
E07			D,L-Lactamide
E08			D-Glucosamine
E09			D-Galactosamine
E10			D-Mannosamine
E11			N-Acetyl-D- Glucosamine
E12			N-Acetyl-D- Galactosamine
F01			N-Acetyl-D- Mannosamine
F02			Adenine
F03			Adenosine
F04			Cytidine
F05			Cytosine
F06			Guanine
F07			Guanosine
F08			Thymine
F09			Thymidine
F10			Uracil
F11			Uridine
F12			Inosine
G01			Xanthine
G02			Xanthosine
G03			Uric Acid
G04			Alloxan
G05			Allantoin
G06			Parabanic Acid
G07			D,L- α -Amino-N- Butyric Acid
G08			γ -Amino-N- Butyric Acid
G09			ϵ -Amino-N- Caproic Acid
G10			D,L- α -Amino- Caprylic Acid
G11			δ -Amino-N- Valeric Acid
G12			α -Amino-N- Valeric Acid
H01			Ala-Asp
H02			Ala-Gln
H03			Ala-Glu
H04			Ala-Gly
H05			Ala-His
H06			Ala-Leu
H07			Ala-Thr
H08			Gly-Asn
H09			Gly-Gln
H10			Gly-Glu
H11			Gly-Met
H12			Met-Ala

PM04 MicroPlate Carbon Sources							
	P0	P200			P0	P200	
A01			Negative Control	E01			O-Phospho-D- Tyrosine
A02			Phosphate	E02			O-Phospho-L- Tyrosine
A03			Pyrophosphate	E03			Phosphocreatine
A04			Trimeta Phosphate	E04			Phosphoryl Choline
A05			Tripoly Phosphate	E05			O-Phosphoryl- Ethanolamine
A06			Triethyl Phosphate	E06			Phosphono Acetic Acid
A07			Hypophosphite	E07			2-Aminoethyl Phosphonic Acid
A08			Adenosine-2'- monophosphate	E08			Methylene Diphosphonic Acid
A09			Adenosine-3'- monophosphate	E09			Thymidine-3'- monophosphate
A10			Adenosine-5'- monophosphate	E10			Thymidine-5'- monophosphate
A11			Adenosine-2',3'- cyclic monophosphate	E11			Inositol Hexaphosphate
A12			Adenosine-3',5'- cyclic monophosphate	E12			Thymidine 3',5'- cyclic monophosphate
B01			Thiophosphate	F01			Negative Control
B02			Dithiophosphate	F02			Sulfate
B03			D,L- α -Glycerol Phosphate	F03			Thiosulfate
B04			β -Glycerol Phosphate	F04			Tetrathionate
B05			Carbamyl Phosphate	F05			Thiophosphate
B06			D-2-Phospho- Glyceric Acid	F06			Dithiophosphate
B07			D-3-Phospho- Glyceric Acid	F07			L-Cysteine
B08			Guanosine-2'- monophosphate	F08			D-Cysteine
B09			Guanosine-3'- monophosphate	F09			L-Cysteiny- Glycine
B10			Guanosine- 5' - monophosphate	F10			L-Cysteic Acid
B11			Guanosine- 2',3'- cyclic monophosphate	F11			Cysteamine
B12			Guanosine- 3',5'- cyclic monophosphate	F12			L-Cysteine Sulfinic Acid
C01			Phosphoenol Piruvato	G01			N-Acetyl-L- Cysteine
C02			Phospho- Glycolic Acid	G02			S-Methyl-L- Cysteine
C03			D-Glucose-1- Phosphate	G03			Cystathionine
C04			D-Glucose-6- Phosphate	G04			Lanthionine
C05			2-Deoxy-D- Glucose-6- Phosphate	G05			Glutathione
C06			D-Glucosamine- 6-Phosphate	G06			D,L-Ethionine
C07			6-Phospho- Gluconic Acid	G07			L-Methionine
C08			Cytidine-2- monophosphate	G08			D-Methionine
C09			Cytidine-3- monophosphate	G09			Glycyl-L- Methionine
C10			Cytidine-5'- monophosphate	G10			N-Acetyl-D,L- Methionine
C11			Cytidine-2',3'- cyclic monophosphate	G11			L-Methionine Sulfoxide
C12			Cytidine-3',5'- cyclic monophosphate	G12			L-Methionine Sulfone
D01			D-Mannose-1- Phosphate	H01			L-Djenkolic Acid
D02			D-Mannose-6- Phosphate	H02			Thiourea
D03			Cysteamine-S- Phosphate	H03			1-Thio- β -D- Glucose
D04			Phospho-L- Arginine	H04			D,L-Lipoamide
D05			O-Phospho-D- Serine	H05			Taurocholic Acid
D06			O-Phospho-L- Serine	H06			Taurine
D07			O-Phospho-L- Threonine	H07			Hypotaurine
D08			Uridine-2'- monophosphate	H08			P-Amino Benzene Sulfonic Acid
D09			Uridine-3'- monophosphate	H09			Butane Sulfonic Acid
D10			Uridine-5'- monophosphate	H10			2-Hydroxyethane Sulfonic Acid
D11			Uridine-2',3'- cyclic monophosphate	H11			Methane Sulfonic Acid
D12			Uridine-3',5'- cyclic monophosphate	H12			Tetramethylene Sulfone

PM11 MicroPlate Carbon Sources			
	P0	P200	
A01			Amikacin
A02			Amikacin
A03			Amikacin
A04			Amikacin
A05			Chlortetracycline
A06			Chlortetracycline
A07			Chlortetracycline
A08			Chlortetracycline
A09			Lincomycin
A10			Lincomycin
A11			Lincomycin
A12			Lincomycin
B01			Amoxicillin
B02			Amoxicillin
B03			Amoxicillin
B04			Amoxicillin
B05			Cloxacillin
B06			Cloxacillin
B07			Cloxacillin
B08			Cloxacillin
B09			Lomefloxacin
B10			Lomefloxacin
B11			Lomefloxacin
B12			Lomefloxacin
C01			Bleomycin
C02			Bleomycin
C03			Bleomycin
C04			Bleomycin
C05			Colistin
C06			Colistin
C07			Colistin
C08			Colistin
C09			Minocycline
C10			Minocycline
C11			Minocycline
C12			Minocycline
D01			Capreomycin
D02			Capreomycin
D03			Capreomycin
D04			Capreomycin
D05			Demeclocycline
D06			Demeclocycline
D07			Demeclocycline
D08			Demeclocycline
D09			Nafcillin
D10			Nafcillin
D11			Nafcillin
D12			Nafcillin
E01			Cefazolin
E02			Cefazolin
E03			Cefazolin
E04			Cefazolin
E05			Enoxacin
E06			Enoxacin
E07			Enoxacin
E08			Enoxacin
E09			Nalidixic acid
E10			Nalidixic acid
E11			Nalidixic acid
E12			Nalidixic acid
F01			Chloramphenicol
F02			Chloramphenicol
F03			Chloramphenicol
F04			Chloramphenicol
F05			Erythromycin
F06			Erythromycin
F07			Erythromycin
F08			Erythromycin
F09			Neomycin
F10			Neomycin
F11			Neomycin
F12			Neomycin
G01			Ceftriaxone
G02			Ceftriaxone
G03			Ceftriaxone
G04			Ceftriaxone
G05			Gentamicin
G06			Gentamicin
G07			Gentamicin
G08			Gentamicin
G09			Potassium tellurite
G10			Potassium tellurite
G11			Potassium tellurite
G12			Potassium tellurite
H01			Cephalothin
H02			Cephalothin
H03			Cephalothin
H04			Cephalothin
H05			Kanamycin
H06			Kanamycin
H07			Kanamycin
H08			Kanamycin
H09			Ofloxacin
H10			Ofloxacin
H11			Ofloxacin
H12			Ofloxacin

PM12 MicroPlate Carbon Sources			
	P0	P200	
A01			Penicillin G
A02			Penicillin G
A03			Penicillin G
A04			Penicillin G
A05			Tetracycline
A06			Tetracycline
A07			Tetracycline
A08			Tetracycline
A09			Carbenicillin
A10			Carbenicillin
A11			Carbenicillin
A12			Carbenicillin
B01			Oxacillin
B02			Oxacillin
B03			Oxacillin
B04			Oxacillin
B05			Penimepicycline
B06			Penimepicycline
B07			Penimepicycline
B08			Penimepicycline
B09			Polymyxin B
B10			Polymyxin B
B11			Polymyxin B
B12			Polymyxin B
C01			Paromomycin
C02			Paromomycin
C03			Paromomycin
C04			Paromomycin
C05			Vancomycin
C06			Vancomycin
C07			Vancomycin
C08			Vancomycin
C09			D,L-Serine hydroxamate
C10			D,L-Serine hydroxamate
C11			D,L-Serine hydroxamate
C12			D,L-Serine hydroxamate
D01			Sisomicin
D02			Sisomicin
D03			Sisomicin
D04			Sisomicin
D05			Sulfamethazine
D06			Sulfamethazine
D07			Sulfamethazine
D08			Sulfamethazine
D09			Novobiocin
D10			Novobiocin
D11			Novobiocin
D12			Novobiocin
E01			2,4-Diamino-6,7- diisopropyl- pteridine
E02			2,4-Diamino-6,7- diisopropyl- pteridine
E03			2,4-Diamino-6,7- diisopropyl- pteridine
E04			2,4-Diamino-6,7- diisopropyl- pteridine
E05			Sulfadiazine
E06			Sulfadiazine
E07			Sulfadiazine
E08			Sulfadiazine
E09			Benzethonium chloride
E10			Benzethonium chloride
E11			Benzethonium chloride
E12			Benzethonium chloride
F01			Tobramycin
F02			Tobramycin
F03			Tobramycin
F04			Tobramycin
F05			Sulfathiazole
F06			Sulfathiazole
F07			Sulfathiazole
F08			Sulfathiazole
F09			5-Fluoroorotic acid
F10			5-Fluoroorotic acid
F11			5-Fluoroorotic acid
F12			5-Fluoroorotic acid
G01			Spectinomycin
G02			Spectinomycin
G03			Spectinomycin
G04			Spectinomycin
G05			Sulfa- methoxazole
G06			Sulfa- methoxazole
G07			Sulfa- methoxazole
G08			Sulfa- methoxazole
G09			L-Aspartic-β- hydroxamate
G10			L-Aspartic-β- hydroxamate
G11			L-Aspartic-β- hydroxamate
G12			L-Aspartic-β- hydroxamate
H01			Spiramycin
H02			Spiramycin
H03			Spiramycin
H04			Spiramycin
H05			Rifampicin
H06			Rifampicin
H07			Rifampicin
H08			Rifampicin
H09			Dodecyltrimethyl ammonium bromide
H10			Dodecyltrimethyl ammonium bromide
H11			Dodecyltrimethyl ammonium bromide
H12			Dodecyltrimethyl ammonium bromide

PM13 MicroPlate Carbon Sources			
	P0	P200	
A01			Ampicillin
A02			Ampicillin
A03			Ampicillin
A04			Ampicillin
A05			Dequalinium chloride
A06			Dequalinium chloride
A07			Dequalinium chloride
A08			Dequalinium chloride
A09			Nickel chloride
A10			Nickel chloride
A11			Nickel chloride
A12			Nickel chloride
B01			Azlocillin
B02			Azlocillin
B03			Azlocillin
B04			Azlocillin
B05			2, 2'-Dipyridyl
B06			2, 2'-Dipyridyl
B07			2, 2'-Dipyridyl
B08			2, 2'-Dipyridyl
B09			Oxolinic acid
B10			Oxolinic acid
B11			Oxolinic acid
B12			Oxolinic acid
C01			6-Mercapto- purine
C02			6-Mercapto- purine
C03			6-Mercapto- purine
C04			6-Mercapto- purine
C05			Doxycycline
C06			Doxycycline
C07			Doxycycline
C08			Doxycycline
C09			Potassium chromate
C10			Potassium chromate
C11			Potassium chromate
C12			Potassium chromate
D01			Cefuroxime
D02			Cefuroxime
D03			Cefuroxime
D04			Cefuroxime
D05			5-Fluorouracil
D06			5-Fluorouracil
D07			5-Fluorouracil
D08			5-Fluorouracil
D09			Rolitettracycline
D10			Rolitettracycline
D11			Rolitettracycline
D12			Rolitettracycline
E01			Cytosine-1-β- D-arabino- furanoside
E02			Cytosine-1-β- D-arabino- furanoside
E03			Cytosine-1-β- D-arabino- furanoside
E04			Cytosine-1-β- D-arabino- furanoside
E05			Geneticin (G418)
E06			Geneticin (G418)
E07			Geneticin (G418)
E08			Geneticin (G418)
E09			Ruthenium red
E10			Ruthenium red
E11			Ruthenium red
E12			Ruthenium red
F01			Cesium chloride
F02			Cesium chloride
F03			Cesium chloride
F04			Cesium chloride
F05			Glycine
F06			Glycine
F07			Glycine
F08			Glycine
F09			Thallium (I) acetate
F10			Thallium (I) acetate
F11			Thallium (I) acetate
F12			Thallium (I) acetate
G01			Cobalt chloride
G02			Cobalt chloride
G03			Cobalt chloride
G04			Cobalt chloride
G05			Manganese chloride
G06			Manganese chloride
G07			Manganese chloride
G08			Manganese chloride
G09			Trifluoperazine
G10			Trifluoperazine
G11			Trifluoperazine
G12			Trifluoperazine
H01			Cupric chloride
H02			Cupric chloride
H03			Cupric chloride
H04			Cupric chloride
H05			Moxalactam
H06			Moxalactam
H07			Moxalactam
H08			Moxalactam
H09			Tylosin
H10			Tylosin
H11			Tylosin
H12			Tylosin

PM14 MicroPlate Carbon Sources			
	P0	P200	
A01			Acriflavine
A02			Acriflavine
A03			Acriflavine
A04			Acriflavine
A05			Furaltadone
A06			Furaltadone
A07			Furaltadone
A08			Furaltadone
A09			Sanguinarine
A10			Sanguinarine
A11			Sanguinarine
A12			Sanguinarine
B01			9-Aminoacridine
B02			9-Aminoacridine
B03			9-Aminoacridine
B04			9-Aminoacridine
B05			Fusaric acid
B06			Fusaric acid
B07			Fusaric acid
B08			Fusaric acid
B09			Sodium arsenate
B10			Sodium arsenate
B11			Sodium arsenate
B12			Sodium arsenate
C01			Boric Acid
C02			Boric Acid
C03			Boric Acid
C04			Boric Acid
C05			1-Hydroxy- pyridine -2- thione
C06			1-Hydroxy- pyridine -2- thione
C07			1-Hydroxy- pyridine -2- thione
C08			1-Hydroxy- pyridine -2- thione
C09			Sodium cyanate
C10			Sodium cyanate
C11			Sodium cyanate
C12			Sodium cyanate
D01			Cadmium chloride
D02			Cadmium chloride
D03			Cadmium chloride
D04			Cadmium chloride
D05			Iodoacetate
D06			Iodoacetate
D07			Iodoacetate
D08			Iodoacetate
D09			Sodium dichromate
D10			Sodium dichromate
D11			Sodium dichromate
D12			Sodium dichromate
E01			Cefoxitin
E02			Cefoxitin
E03			Cefoxitin
E04			Cefoxitin
E05			Nitrofurantoin
E06			Nitrofurantoin
E07			Nitrofurantoin
E08			Nitrofurantoin
E09			Sodium metaborate
E10			Sodium metaborate
E11			Sodium metaborate
E12			Sodium metaborate
F01			Chloramphenicol
F02			Chloramphenicol
F03			Chloramphenicol
F04			Chloramphenicol
F05			Piperacillin
F06			Piperacillin
F07			Piperacillin
F08			Piperacillin
F09			Sodium metavanadate
F10			Sodium metavanadate
F11			Sodium metavanadate
F12			Sodium metavanadate
G01			Chelerythrine
G02			Chelerythrine
G03			Chelerythrine
G04			Chelerythrine
G05			Carbenicillin
G06			Carbenicillin
G07			Carbenicillin
G08			Carbenicillin
G09			Sodium nitrite
G10			Sodium nitrite
G11			Sodium nitrite
G12			Sodium nitrite
H01			EGTA
H02			EGTA
H03			EGTA
H04			EGTA
H05			Promethazine
H06			Promethazine
H07			Promethazine
H08			Promethazine
H09			Sodium orthovanadate
H10			Sodium orthovanadate
H11			Sodium orthovanadate
H12			Sodium orthovanadate

PM16 MicroPlate Carbon Sources			
	P0	P200	
A01	Orange	Orange	Cefotaxime
A02	Orange	Orange	Cefotaxime
A03	Orange	Orange	Cefotaxime
A04	Orange	Orange	Cefotaxime
A05	Orange	Orange	Phosphomycin
A06	Orange	Orange	Phosphomycin
A07	Orange	Orange	Phosphomycin
A08	Orange	Orange	Phosphomycin
A09	Orange	Orange	5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline
A10	Orange	Red	5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline
A11	Blue	Blue	5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline
A12	Blue	Blue	5-Chloro-7-iodo- 8-hydroxy- quinoline
B01	Orange	Orange	Norfloxacin
B02	Orange	Orange	Norfloxacin
B03	Orange	Orange	Norfloxacin
B04	Orange	Orange	Norfloxacin
B05	Orange	Orange	Sulfanilamide
B06	Orange	Orange	Sulfanilamide
B07	Orange	Orange	Sulfanilamide
B08	Orange	Red	Sulfanilamide
B09	Orange	Orange	Trimethoprim
B10	Orange	Orange	Trimethoprim
B11	Orange	Orange	Trimethoprim
B12	Orange	Orange	Trimethoprim
C01	Blue	Blue	Dichlofluamid
C02	Blue	Blue	Dichlofluamid
C03	Blue	Blue	Dichlofluamid
C04	Blue	Blue	Dichlofluamid
C05	Orange	Orange	Protamine sulfate
C06	Orange	Orange	Protamine sulfate
C07	Orange	Orange	Protamine sulfate
C08	Orange	Orange	Protamine sulfate
C09	Orange	Orange	Cetylpyridinium chloride
C10	Orange	Orange	Cetylpyridinium chloride
C11	Blue	Blue	Cetylpyridinium chloride
C12	Blue	Blue	Cetylpyridinium chloride
D01	Orange	Orange	1-Chloro -2,4- dinitrobenzene
D02	Blue	Blue	1-Chloro -2,4- dinitrobenzene
D03	Blue	Blue	1-Chloro -2,4- dinitrobenzene
D04	Blue	Blue	1-Chloro -2,4- dinitrobenzene
D05	Blue	Blue	Diamide
D06	Orange	Orange	Diamide
D07	Orange	Orange	Diamide
D08	Blue	Blue	Diamide
D09	Orange	Orange	Cinoxacin
D10	Orange	Orange	Cinoxacin
D11	Orange	Orange	Cinoxacin
D12	Orange	Orange	Cinoxacin
E01	Orange	Orange	Streptomycin
E02	Orange	Orange	Streptomycin
E03	Orange	Orange	Streptomycin
E04	Orange	Red	Streptomycin
E05	Orange	Orange	5-Azacytidine
E06	Orange	Orange	5-Azacytidine
E07	Orange	Orange	5-Azacytidine
E08	Orange	Orange	5-Azacytidine
E09	Orange	Orange	Rifamycin SV
E10	Orange	Orange	Rifamycin SV
E11	Orange	Orange	Rifamycin SV
E12	Orange	Orange	Rifamycin SV
F01	Orange	Orange	Potassium tellurite
F02	Orange	Orange	Potassium tellurite
F03	Orange	Orange	Potassium tellurite
F04	Orange	Orange	Potassium tellurite
F05	Orange	Orange	Sodium selenite
F06	Orange	Orange	Sodium selenite
F07	Blue	Blue	Sodium selenite
F08	Blue	Blue	Sodium selenite
F09	Orange	Orange	Aluminum sulfate
F10	Orange	Orange	Aluminum sulfate
F11	Orange	Orange	Aluminum sulfate
F12	Orange	Orange	Aluminum sulfate
G01	Orange	Orange	Chromium chloride
G02	Orange	Orange	Chromium chloride
G03	Orange	Orange	Chromium chloride
G04	Orange	Orange	Chromium chloride
G05	Orange	Orange	Ferric chloride
G06	Orange	Orange	Ferric chloride
G07	Orange	Orange	Ferric chloride
G08	Blue	Blue	Ferric chloride
G09	Orange	Orange	L-Glutamic-g- hydroxamate
G10	Orange	Orange	L-Glutamic-g- hydroxamate
G11	Orange	Orange	L-Glutamic-g- hydroxamate
G12	Orange	Orange	L-Glutamic-g- hydroxamate
H01	Orange	Orange	Glycine hydroxamate
H02	Orange	Orange	Glycine hydroxamate
H03	Orange	Orange	Glycine hydroxamate
H04	Orange	Orange	Glycine hydroxamate
H05	Orange	Orange	Chloroxyleneol
H06	Orange	Orange	Chloroxyleneol
H07	Orange	Orange	Chloroxyleneol
H08	Orange	Orange	Chloroxyleneol
H09	Orange	Orange	Sorbic acid
H10	Orange	Orange	Sorbic acid
H11	Orange	Orange	Sodium orthovanadate
H12	Orange	Orange	Sodium orthovanadate

PM17 MicroPlate Carbon Sources			
	P0	P200	
A01			D-Serine
A02			D-Serine
A03			D-Serine
A04			D-Serine
A05			β -Chloro-L-alanine hydrochloride
A06			β -Chloro-L-alanine hydrochloride
A07			β -Chloro-L-alanine hydrochloride
A08			β -Chloro-L-alanine hydrochloride
A09			Thiosalicylic acid
A10			Thiosalicylic acid
A11			Thiosalicylic acid
A12			Thiosalicylic acid
B01			Sodium salicylate
B02			Sodium salicylate
B03			Sodium salicylate
B04			Sodium salicylate
B05			Hygromycin B
B06			Hygromycin B
B07			Hygromycin B
B08			Hygromycin B
B09			Ethionamide
B10			Ethionamide
B11			Ethionamide
B12			Ethionamide
C01			4-Aminopyridine
C02			4-Aminopyridine
C03			4-Aminopyridine
C04			4-Aminopyridine
C05			Sulfachloro- pyridazine
C06			Sulfachloro- pyridazine
C07			Sulfachloro- pyridazine
C08			Sulfachloro- pyridazine
C09			Sulfamono- methoxine
C10			Sulfamono- methoxine
C11			Sulfamono- methoxine
C12			Sulfamono- methoxine
D01			Oxycarboxin
D02			Oxycarboxin
D03			Oxycarboxin
D04			Oxycarboxin
D05			3-Amino-1,2,4-triazole
D06			3-Amino-1,2,4-triazole
D07			3-Amino-1,2,4-triazole
D08			3-Amino-1,2,4-triazole
D09			Chlorpromazine
D10			Chlorpromazine
D11			Chlorpromazine
D12			Chlorpromazine
E01			Niaproof
E02			Niaproof
E03			Niaproof
E04			Niaproof
E05			Compound 48/80
E06			Compound 48/80
E07			Compound 48/80
E08			Compound 48/80
E09			Sodium tungstate
E10			Sodium tungstate
E11			Sodium tungstate
E12			Sodium tungstate
F01			Lithium chloride
F02			Lithium chloride
F03			Lithium chloride
F04			Lithium chloride
F05			DL-Methionine hydroxamate
F06			DL-Methionine hydroxamate
F07			DL-Methionine hydroxamate
F08			DL-Methionine hydroxamate
F09			Tannic acid
F10			Tannic acid
F11			Tannic acid
F12			Tannic acid
G01			Chlorambucil
G02			Chlorambucil
G03			Chlorambucil
G04			Chlorambucil
G05			Cefamandole nafate
G06			Cefamandole nafate
G07			Cefamandole nafate
G08			Cefamandole nafate
G09			Cefoperazone
G10			Cefoperazone
G11			Cefoperazone
G12			Cefoperazone
H01			Cefsulodin
H02			Cefsulodin
H03			Cefsulodin
H04			Cefsulodin
H05			Caffeine
H06			Caffeine
H07			Caffeine
H08			Caffeine
H09			Phenylarsine oxide
H10			Phenylarsine oxide
H11			Phenylarsine oxide
H12			Phenylarsine oxide

PM18 MicroPlate Carbon Sources			
	P0	P200	
A01			Ketoprofen
A02			Ketoprofen
A03			Ketoprofen
A04			Ketoprofen
A05			Sodium pyrophosphate decahydrate
A06			Sodium pyrophosphate decahydrate
A07			Sodium pyrophosphate decahydrate
A08			Sodium pyrophosphate decahydrate
A09			Thiamphenicol
A10			Thiamphenicol
A11			Thiamphenicol
A12			Thiamphenicol
B01			Trifluorothymidin e
B02			Trifluorothymidin e
B03			Trifluorothymidin e
B04			Trifluorothymidin e
B05			Pipemidic Acid
B06			Pipemidic Acid
B07			Pipemidic Acid
B08			Pipemidic Acid
B09			Azathioprine
B10			Azathioprine
B11			Azathioprine
B12			Azathioprine
C01			Poly-L-lysine
C02			Poly-L-lysine
C03			Poly-L-lysine
C04			Poly-L-lysine
C05			Sulfisoxazole
C06			Sulfisoxazole
C07			Sulfisoxazole
C08			Sulfisoxazole
C09			Pentachloro- phenol
C10			Pentachloro- phenol
C11			Pentachloro- phenol
C12			Pentachloro- phenol
D01			Sodium m-arsenite
D02			Sodium m-arsenite
D03			Sodium m-arsenite
D04			Sodium m-arsenite
D05			Sodium bromate
D06			Sodium bromate
D07			Sodium bromate
D08			Sodium bromate
D09			Lidocaine
D10			Lidocaine
D11			Lidocaine
D12			Lidocaine
E01			Sodium metasilicate
E02			Sodium metasilicate
E03			Sodium metasilicate
E04			Sodium metasilicate
E05			Sodium m-periodate
E06			Sodium m-periodate
E07			Sodium m-periodate
E08			Sodium m-periodate
E09			Antimony (III) chloride
E10			Antimony (III) chloride
E11			Antimony (III) chloride
E12			Antimony (III) chloride
F01			Semicarbazide
F02			Semicarbazide
F03			Semicarbazide
F04			Semicarbazide
F05			Tinidazole
F06			Tinidazole
F07			Tinidazole
F08			Tinidazole
F09			Aztreonam
F10			Aztreonam
F11			Aztreonam
F12			Aztreonam
G01			Triclosan
G02			Triclosan
G03			Triclosan
G04			Triclosan
G05			3,5-Diamino- 1,2,4-triazole (Guanazole)
G06			3,5-Diamino- 1,2,4-triazole (Guanazole)
G07			3,5-Diamino- 1,2,4-triazole (Guanazole)
G08			3,5-Diamino- 1,2,4-triazole (Guanazole)
G09			Myricetin
G10			Myricetin
G11			Myricetin
G12			Myricetin
H01			5-fluoro-5'- deoxyuridine
H02			5-fluoro-5'- deoxyuridine
H03			5-fluoro-5'- deoxyuridine
H04			5-fluoro-5'- deoxyuridine
H05			2-Phenylphenol
H06			2-Phenylphenol
H07			2-Phenylphenol
H08			2-Phenylphenol
H09			Plumbagin
H10			Plumbagin
H11			Plumbagin
H12			Plumbagin

Anexo 2. A continuación se muestran las imágenes donde se aprecia el crecimiento de la bacteria de diferentes cepas en los 6 diferentes reactivos ya descritos en resultados.



Figura 6. Reactivo de tween 20 en P0 (A), P170 (B) y P180 (C), donde se compara el crecimiento con la turbidez de los tubos de ensayo. P0 (+++), P170 (++) y P180 (+).



Figura 7. Reactivo de tween 40 en P0 (A), P170 (B) y P180 (C), donde se compara el crecimiento con la turbidez de los tubos de ensayo. P0 (+++), P170 (++) y P180 (+).



Figura 8. Reactivo de tween 80 en P0 (A), P160 (B) y P170 (C), donde se compara el crecimiento con la turbidez de los tubos de ensayo. P0 (+++), P160 (++) y P170 (+).



Figura 9. Reactivo de tween 20 en P0 (A), P160 (B) y P170 (C), donde se compara el crecimiento con la turbidez de los tubos de ensayo. P0 (+++), P160 (++) y P170 (+).



Figura 10. Reactivo de tween 20 en P0 (A), P140 (B) y P150 (C), donde se compara el crecimiento con la turbidez de los tubos de ensayo. P0 (+++), P140 (++) y P150 (+).

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Luis Álvaro Gómez García

Candidato para el grado de Especialidad en Dermatología

Tesis: Estudio de la expresión fenotípica y genética de una cepa atenuada de *Nocardia brasiliensis*.

Campo de estudio: Ciencias de la salud

Biografía: Nacido el 10 de abril de 1988 en Monterrey, Nuevo León, México. Hijo de Luis Gerardo Gómez Zepeda y Yolanda Ivette García Ruan. Hermanos: Gerardo Daniel Gómez García, Pamela Ivette Gomez García y Jesús Alejandro Gómez García.

Educación: Primaria y secundaria realizada en el Colegio Cumbres, en Torreón, Coahuila. Bachillerato en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, cursado en Torreón, Coahuila. Egresado de la Escuela de Medicina Ignacio A. Santos del Tecnológico de Monterrey, grado obtenido de Médico Cirujano (2007-2014).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

13 de Diciembre de 2021

Subdirector de Estudios de Posgrado

Presente. -

Por medio de la presente, me permito saludarlo y a su vez informar que el trabajo de tesis de la **Dr. Luis Álvaro Gómez García**, con matrícula **1940933**, titulado **“Estudio de la expresión fenotípica y genética de una cepa atenuada de Nocardia brasiliensis”** fue evaluado mediante la herramienta Turnitin para la detección de similitud y plagio.

Los resultados fueron los siguientes:

- Porcentaje de similitud: 12%
- Similitud máxima con documentos existentes: 5%

En base a lo anterior y a la reglamentación de no superar un 30% de similitud, me permito dictaminar que no considero que exista evidencia de plagio en el trabajo.

Se adjunta el dictamen de Turnitin en caso de ser requerido para su verificación.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

“Alere Flamman Veritatis”

Monterrey, NL.

Dra. med. Minerva Gómez Flores

Coordinadora de Enseñanza de Posgrado del
Programa de Especialización en Dermatología
Hospital Universitario “Dr. José E. González”

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA

Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitrás Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L., México. Tel.: (81) 8348 1465,
Conmutador: (81) 8389 1111, ext. 3198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologiauanl.com



DERMATOLOGÍA
HOSPITAL UNIVERSITARIO

Turnitin Informe de Originalidad

Procesado el: 12-dic.-2021 9:14 a. m. CST
 Identificador: 1727820349
 Número de palabras: 6997
 Entregado: 2

Tesis Luis Gómez Por Luis Gomez

Índice de similitud

12%

Similitud según fuente

Internet Sources:	12%
Publicaciones:	1%
Trabajos del estudiante:	6%

5% match (trabajos de los estudiantes desde 04-nov.-2016)

[Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2016-11-04](#)

1% match (Internet desde 05-ene.-2021)

<http://eprints.uanl.mx/20520/185/20520.pdf>

1% match ()

[Campos Rivera, Mayra Paola. "Caracterización genética de una cepa atenuada de nocardia brasiliensis HUJEG-1", 2012](#)

1% match ()

[González Carrillo, Carolina. "Atenuación de Nocardia brasiliensis mediante 200 cultivos seriados in vitro.", 2017](#)

1% match ()

[Tang, John Yew Huat, Carlson, J. et al. "Phenotypic MicroArray \(PM\) profiles \(carbon sources and sensitivity to osmolytes and pH\) of Campylobacter jejuni ATCC 33560 in response to temperature", Faculty of Food Science and Technology, Universiti Putra Malaysia, 2010](#)

< 1% match (trabajos de los estudiantes desde 24-mar.-2021)

[Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2021-03-24](#)

< 1% match (trabajos de los estudiantes desde 17-dic.-2020)

[Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2020-12-17](#)

< 1% match (trabajos de los estudiantes desde 18-dic.-2020)

[Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2020-12-18](#)

< 1% match ()

[Cueeto Ramos, Rubén Gerardo. "Determinación de la relación del tiempo de decantación y la separación de componentes en el lipoaspirado", 2019](#)

< 1% match ()

[Estrada Rivera, Emma Lizeth. "Profilaxis personalizada en pacientes pediátricos mexicanos con hemofilia A severa mediante la determinación de farmacocinética del Factor VIII", 2019](#)

< 1% match (Internet desde 22-jul.-2019)

<https://docplayer.es/80827780-Universidad-de-guayaquil.html>

< 1% match (Internet desde 27-nov.-2020)

<https://qdoc.tips/manual-microbiologia-pdf-free.html>

< 1% match (Internet desde 23-jun.-2017)

<http://apps.wiley.com/publicaciones/item/pdf?estadoItem=S300&idApp=UINPBA00004N&idiomaItem=es&origen=zonadelectura&pii=X1665579613741077&textMensaje=Documento+descargad+06-2017&urlApp=http%3A%2F%2Fwww.elsevier.es&web=zonadelectura>

< 1% match (Internet desde 22-nov.-2021)

https://docshare.tips/vol3num32012_58d15107ee3435de0e6e4593.html

< 1% match (trabajos de los estudiantes desde 04-dic.-2021)

[Submitted to Liberty University on 2021-12-04](#)

< 1% match (Internet desde 07-dic.-2020)

http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=35177531&fecha=3D10/02/2011

< 1% match (Internet desde 10-may.-2021)

<https://rsdjjournal.org/index.php/rsd/article/download/12041/11650/169669>

< 1% match (Internet desde 16-sept.-2021)

<https://dialogos.flar.com/product/out-of-stock-album/>

< 1% match (publicaciones)

[Larissa Tâtero Carvalho. "Caracterização física, química, histológica, sensorial e tecnológica da carne de peito de perus acometidos pela miopatia >i/j<", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica \(AGUIA\), 2020](#)

< 1% match ()

http://redpav-fpolar.info.ve/fagro/v16_02/1602m010.html

< 1% match ()

<http://www.icmm.csic.es/pomt/PRESIONES.htm>

< 1% match (Internet desde 05-oct.-2016)