

ANÁLISIS DEL EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia origanoides* SOBRE EL PROTEOMA DE  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

MARÍA PAULA TURIZO VARGAS

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
Química

Directores:

WILLIAM FERNANDO HIDALGO BUCHELI

Doctor en Química

JENNIFER ANDREA RUIZ DURAN

Microbióloga y bioanalista



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2024

*A mis padres y hermana*

*Gracias por ser mi inspiración y mi apoyo para nunca darme por vencida*

*A mis maestros*

*Por la dedicación para compartir los conocimientos que me han guiado hasta este punto*

*A mis amigos*

*Por acompañarme en este camino y hacerlo más sencillo*

*A mi abuelita*

*Por ser mi más grande ejemplo de perseverancia y disciplina para cumplir mis sueños*

*A Fabian*

*Por darme la mano en los momentos que más lo necesité*

## Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander, por ser mi hogar, por la oportunidad de formar parte de esta prestigiosa institución, a cada maestro que hizo parte de mi formación a lo largo de estos años, su dedicación por la enseñanza ha sido una fuente constante de inspiración.

Al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, GIBIM, por abrir sus puertas para mí y ayudarme a culminar este proceso de la mejor manera posible. De forma especial al profesor William Hidalgo por permitirme ejecutar esta investigación y crecer profesionalmente.

Al Grupo de Espectroscopia Atómica y Molecular LEAM, al Laboratorio de Espectrometría de Masas y al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales CINTROP, por permitir amablemente el uso de sus instalaciones en el desarrollo de mi trabajo de grado, Tefa, Yuly, Ian y Heider, gracias por el apoyo.

A Jennifer, por tanta paciencia, por compartir su conocimiento conmigo, por cada enseñanza y corrección, por su compromiso, liderazgo y amabilidad en cada paso dado en este proyecto; gracias por guiarme y confiar esta investigación en mí, te admiro demasiado.

Al profesor Orlando Bermúdez, por dejar una huella imborrable en mi vida, por concederme la vocación de química y enseñarme tantas cosas, tanto profesionales como personales, lo recuerdo siempre.

A mi mamá Aurora y mi papá José Manuel, por su constante apoyo, gracias por la confianza que depositan en mí y el esfuerzo que han hecho siempre para ayudarme a cumplir mis metas. Gracias por darle prioridad e importancia a mis deseos por encima de los suyos.

A mi hermana Andrea por ser mi guía, mi mentora y mi ejemplo en la vida, por creer en mis capacidades y corregirme cada vez que lo necesito; gracias por defenderme, darme fortaleza para ser grande y por compartir cada logro conmigo.

A Fabian, mi polo a tierra, gracias por todo lo que me enseñas cada día, y por darme fuerza en los momentos más difíciles.

A mi nonita Flor, gracias por enseñarme que los sueños se cumplen por difícil que parezcan, por ser ejemplo de entereza, de lucha y de amor.

A mis amigos, los que recorrieron este camino conmigo, con quienes creé recuerdos valiosos y viví momentos únicos, Sebas, Anderson, Luisa, Nicolle, Sebastian y Yenny, gracias por entenderme y apoyarme cuando ni yo misma lo hacía.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN .....	12
1. OBJETIVOS .....	15
1.1 Objetivo General .....	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
2. MARCO TEÓRICO.....	16
2.1 Resistencia múltiple a antimicrobianos .....	16
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
2.3 Aceites esenciales bioactivos .....	20
2.4 Proteómica como herramienta para el análisis de rutas metabólicas .....	23
2.4.1 Electroforesis bidimensional como método de separación de proteínas .....	24
2.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF como técnica para identificación de proteínas .....	26
2.5.1 Servidor MASCOT de Matrix Science .....	28
3. METODOLOGÍA .....	29
3.1 Actividad antibacteriana de <i>P. aeruginosa</i> .....	30
3.2 Obtención de la biomasa bacteriana de <i>P. aeruginosa</i> .....	31
3.3 Extracción, precipitación y solubilización de proteínas .....	32
3.4 Cuantificación de proteínas.....	33
3.5 Electroforesis bidimensional (2D) .....	34
3.5.1 Para primera dimensión (Enfoque isoelectrico).....	34
3.5.2 Para segunda dimensión (SDS-PAGE).....	35
3.6 Lectura y análisis de imágenes .....	35

3.7 Identificación de proteínas diferenciales .....	36
3.8 Análisis bioinformático.....	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
4.1 Actividad biológica de <i>L. origanoides</i> sobre la expresión de <i>P. aeruginosa</i> .....	39
4.2 Cuantificación de Proteínas por el método de Bradford.....	40
4.3 Análisis de proteínas de <i>P. aeruginosa</i> expresadas diferencialmente .....	41
4.4 Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF utilizando las herramientas de búsqueda MASCOT y UniProt .....	45
4.5 Análisis bioinformático mediante PANTHER y STRING.....	47
5. CONCLUSIONES .....	55
RECOMENDACIONES.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
APÉNDICES.....	73

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. A. Tinción de Gram de <i>P. aeruginosa</i> vista a 100 X en un microscopio de luz blanca. B. Micrografía electrónica de <i>P. aeruginosa</i> . Tomado de (CDC, 2019).....	18
Figura 2. Principales compuestos químicos de los AE. Adaptado de: (Ni et al., 2021).....	20
Figura 3. Mecanismos de acción de los AE en las células. Adaptado de: (Ni et al., 2021).....	21
Figura 4. Procedimiento para actividad antimicrobiana de LOT-II sobre <i>P. aeruginosa</i> .....	30
Figura 5. Procedimiento para la formación del pellet de <i>P. aeruginosa</i> .....	31
Figura 6. Procedimiento para la extracción, precipitación y solubilización de proteínas.....	33
Figura 7. Procedimiento para la cuantificación de proteínas .....	34
Figura 8. Procedimiento para la separación de proteínas en gel de electroforesis 2D-PAGE.....	34
Figura 9. Procedimiento para la identificación de proteínas diferenciales .....	37
Figura 10. Cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> durante exposición a diferentes concentraciones de AE de LOT-II .....	39
Figura 11. Diagrama de dispersión: Relación entre densidad de píxel de los controles vs tratamientos.....	42
Figura 12. Geles 2D-PAGE representativos de control y tratamiento con LOT-II de <i>P. aeruginosa</i> .....	43
Figura 13. Procesos biológicos en los que están involucradas las proteínas diferenciales de <i>P. aeruginosa</i> expresadas en respuesta al tratamiento con el AE LOT-II. Construido en: PANTHER .....	47
Figura 14. Interactoma de proteínas expresadas diferencialmente por <i>P. aeruginosa</i> en respuesta al aceite esencial LOT-II. Construido en: STRING v12.0.....	50

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Principales componentes del AE de <i>Lippia origanoides</i> . Adaptado de: (Ruiz-Duran et al., 2023) .....	22
Tabla 2. Concentración de las proteínas extraídas de <i>P. aeruginosa</i> .....	41
Tabla 3. Spots que presentaron inhibición o sobreexpresión de proteína al someterse a tratamiento .....	44
Tabla 4. Proteínas de <i>P. aeruginosa</i> sobreexpresadas con el tratamiento con LOT-II.....	45
Tabla 5. Proteínas de <i>P. aeruginosa</i> inhibidas diferencialmente con el tratamiento con LOT-II	46
Tabla 6. Enriquecimientos funcionales en la red de interacciones de proteínas identificadas .....	54

## LISTA DE APÉNDICES

	<b>Pág.</b>
APÉNDICE A. Información detallada de la cuantificación de proteínas .....	73
APÉNDICE B. Información detallada de la electroforesis bidimensional 2D-PAGE .....	74
APÉNDICE C. Ensayos estadísticos .....	75
APÉNDICE D. Espectros de masas de calibración .....	76
APÉNDICE E. Espectros de masas de los spots diferenciales .....	77
APÉNDICE F. Información detallada de la identificación de proteínas en MASCOT .....	81

## ABREVIATURAS

**2D-PAGE:** Electroforesis Bidimensional en Gel de Poliacrilamida

**AE:** Aceite Esencial

**LOT-II:** *Lippia Origanoides* quimiotipo timol

**BL:** Buffer de Lisis

**BSA:** Albúmina de Suero Bovino

**DTT:** Ditioneitol

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**GS/MS:** Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

**IEF:** Enfoque isoeléctrico

**LB:** Medio Luria Bertani

**MALDI-TOF MS:** Espectrometría de masas de ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo

**MDR:** Resistencia a múltiples fármacos

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonio

**PSA:** Persulfato de amonio

**SDS:** Dodecilsulfato Sódico

**SDS-PAGE:** Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico

**TEMED:** Tetrametildiamina

**TRIS:** Trisaminometano

## RESUMEN

**Título:** Análisis del efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre el proteoma de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853\*

**Autor:** María Paula Turizo Vargas\*\*

**Palabras Clave:** Bacterias multirresistentes, *Pseudomonas aeruginosa*, aceites esenciales, *Lippia origanoides*, perfil de proteínas, espectrometría de masas.

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en una amenaza global para la salud pública y el desarrollo económico, evidenciando la necesidad de impulsar nuevas estrategias programáticas para abordar este desafío. Diversos estudios han evidenciado que los aceites esenciales (AE) sirven como alternativas terapéuticas para el control de bacterias multirresistentes. En particular, se ha demostrado que la especie vegetal *Lippia origanoides* posee efectos antimicrobianos debido a su composición química.

El propósito principal de esta investigación fue analizar el perfil proteico de *P. aeruginosa* tratado con el AE de *Lippia origanoides*. Para ello, se llevó a cabo la extracción de proteínas de *P. aeruginosa* en su estado planctónico, tanto del grupo de control como de tratamiento. Después, se llevó a cabo un análisis mediante electroforesis bidimensional 2D-SDSPAGE para separar y visualizar las proteínas. Con el objetivo de identificar las proteínas que mostraron una expresión diferencial entre los dos grupos, se realizaron análisis detallados utilizando el software PDQUEST. Los spots que mostraron cambios significativos en su expresión se seleccionaron para análisis por MALDI-TOF MS. Con la ayuda de la herramienta MASCOT, se logró identificar las proteínas. Finalmente, para entender mejor el impacto de estos cambios en la expresión proteica, se construyó una red de interacciones predictivas asociadas con las proteínas diferenciales. Este análisis se realizó utilizando el software STRING, permitiendo así visualizar las posibles interacciones y procesos biológicos afectados por la exposición al AE de *L. origanoides*.

Se lograron identificar 15 proteínas expresadas diferencialmente, cinco de ellas sobreexpresadas, y otras diez inhibidas. La construcción del interactoma evidenció que las proteínas inhibidas son fundamentales en los procesos de traducción y producción de energía en la célula; mientras que las proteínas sobreexpresadas son una respuesta a los estímulos y daños causados por el estrés oxidativo. Este trabajo permitió evidenciar que el AE de *L. origanoides* genera una alteración en *P. aeruginosa*, afectando su metabolismo energético y capacidad de supervivencia.

---

\* Trabajo de Grado para optar por el título de Química.

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Doctor en Química.

Codirectora: Jennifer Andrea Ruiz Duran. Microbióloga y Bioanalista.

## ABSTRACT

**Title:** Analysis of the effect of the essential oil of *Lippia origanoides* on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853\*

**Author(s):** María Paula Turizo Vargas\*\*

**Key Words:** Multidrug-resistant bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, essential oils, *Lippia origanoides*, protein profiling, mass spectrometry.

Antimicrobial resistance has become a global threat to public health and economic development, highlighting the need to promote new programmatic strategies to address this challenge. Several studies have shown that essential oils (EOs) serve as therapeutic alternatives for the control of multidrug-resistant bacteria. In particular, the plant species *Lippia origanoides* has been shown to possess antimicrobial effects due to its chemical composition.

The main purpose of this research was to analyze the protein profile of *P. aeruginosa* treated with *Lippia origanoides* EO. For this purpose, the extraction of proteins from *P. aeruginosa* in its chemical composition was carried out. *P. aeruginosa* in its planktonic state, both from the control and treatment groups. Then, a 2D-SDSPAGE two-dimensional electrophoresis analysis was carried out to separate and visualize the proteins. To identify proteins that showed differential expression between the two groups, detailed analyses were performed using PDQUEST software. Spots that showed significant changes in expression were selected for analysis by MALDI-TOF MS. With the help of the MASCOT tool, protein identification was achieved. Finally, to better understand the impact of these changes on protein expression, a predictive interaction network associated with the differential proteins was constructed. This analysis was performed using STRING software, allowing us to visualize the possible interactions and biological processes affected by exposure to *L. origanoides* EO.

Fifteen differentially expressed proteins were identified, five of which were overexpressed, and another ten were inhibited. The construction of the interactome showed that the inhibited proteins are fundamental in the processes of translation and energy production in the cell; while the overexpressed proteins are a response to the stimuli and damage caused by oxidative stress. This work allowed us to demonstrate that the essential oil (EO) of *L. origanoides* causes an alteration in *P. aeruginosa*, affecting its energy metabolism and survival capacity.

---

\* Bachelor Thesis to qualify for the degree of Chemist.

\*\*Faculty of Science. School of Chemistry.

Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Ph.D. in Chemistry.

Co-Director: Jennifer Andrea Ruiz Duran. Microbiologist and Bioanalyst.

## INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa, móvil y aeróbica perteneciente a Gammaproteobacteria. Este microorganismo es ubicuo a ambientes húmedos, como aquellos asociados al suelo y a fuentes hídricas; sin embargo, también puede encontrarse en la comunidad, especialmente en ambientes clínicos, ya que posee la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas como la superficie de objetos metálicos y plásticos, e incluso en sustancias como el jabón (Moradali et al., 2017). Esta especie es considerada de gran importancia por su impacto en la salud debido a su carácter oportunista, capaz de causar enfermedades tanto en plantas como en animales, incluidos los seres humanos (Diggle & Whiteley, 2020). A nivel mundial ha sido clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un patógeno crítico para la investigación y el desarrollo, pues se caracteriza por su carácter multirresistente a los fármacos, que ha conllevado a tratamientos fallidos, causando una mayor morbilidad y mortalidad, especialmente en los pacientes comprometidos inmunológicamente (Adenipekun et al., 2023; Centers for Disease Control and Prevention, 2019; World Health Organization, 2017). De acuerdo con los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), en 2017, *P. aeruginosa* causó un estimado de 32600 infecciones entre pacientes hospitalizados y 2700 muertes estimadas en los Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Este microorganismo es particularmente peligroso para las personas con sistemas inmunológicos debilitados, específicamente para los pacientes con fibrosis quística, quemaduras graves, o aquellos que se encuentran en unidades de cuidados intensivos.

Una de las alternativas terapéuticas que se ha propuesto para erradicar el problema de resistencia bacteriana y para el control de microorganismos de interés clínico como *P. aeruginosa* se basa en la aplicación de aceites esenciales (AE) (Razdan et al., 2022). La actividad de los AEs se asocia a la capacidad de modificar la integridad de la membrana bacteriana, provocando la filtración del contenido celular, lo cual ocasiona una inmediata muerte celular (Oz et al., 2021). Sin embargo, este efecto no es generalizado y puede variar dependiendo de la composición y origen del AE, como del microorganismo objetivo. Los compuestos aromáticos que constituyen los AE presentan actividad antioxidante y antimicrobiana y un amplio espectro de acción (Paz-Zarza et al., 2019). Es importante destacar que la eficiencia de los AEs depende directamente de múltiples factores como su composición química, la concentración empleada, y el microorganismo blanco tratado (Blanco Hernández et al., 2019).

Unos de los aceites esenciales que han sido ampliamente estudiados son los destilados del género de *Lippia*, debido a sus propiedades, tales como actividad analgésica, antiinflamatoria, antipirética, sedante, antifúngica, antihipertensivas, larvicidas, repelentes y antimicrobianas (Ribeiro et al., 2021). Las plantas medicinales y aromáticas poseen una abundancia de aceites esenciales y han sido utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades cutáneas, gastrointestinales y hepáticas (Oliveira et al., 2007). Investigaciones recientes sobre sus propiedades biológicas y químicas han permitido demostrar científicamente su potencial bioactivo y medicinal (Quiguanás-Guarín et al., 2021; Ribeiro et al., 2021). A pesar de que múltiples investigadores han demostrado el potencial biológico de los AE, aún faltan estudios para elucidar el posible mecanismo de acción de estos sobre *P. aeruginosa* y otros microorganismos de estudio.

Pocos estudios se han centrado en el estudio de los efectos y mecanismos moleculares del AE de *L. origanoides* sobre *P. aeruginosa*. Por lo tanto, a través de un análisis proteómico, en la presente investigación se estudió el efecto que tiene el AE de *L. origanoides* sobre la expresión de proteínas en *P. aeruginosa* durante su crecimiento.

Para ello, se hizo uso de dos de las principales técnicas utilizadas para la identificación de proteínas, Electroforesis Bidimensional 2D-PAGE y la Espectrometría de Masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz MALDI-TOF MS. La unión de estas dos técnicas se convierte en una herramienta poderosa para las investigaciones en ciencias biomédicas, donde la identificación y cuantificación de proteínas puede proporcionar información valiosa sobre los procesos biológicos y las enfermedades (Bio, 2023).

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo General

Explorar y analizar el perfil del microorganismo *P. aeruginosa* ATCC 27853 mediante una aproximación basada en proteómica y el tratamiento de la bacteria con el aceite esencial bioactivo de *Lippia origanoides* en una concentración subinhibitoria.

### 1.2 Objetivos Específicos

1. Exponer a la bacteria *P. aeruginosa* a una concentración subinhibitoria del aceite esencial de *Lippia origanoides* con el fin de analizar su proteoma y obtener una visión de cómo la bacteria responde a este compuesto bioactivo.
2. Comparar los patrones de expresión de proteínas de *P. aeruginosa* en presencia y ausencia del aceite esencial de *Lippia origanoides* mediante experimentos de electroforesis bidimensional.
3. Identificar las proteínas que muestren niveles de expresión diferencial, haciendo uso de la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF y comparar los perfiles proteicos de las muestras en presencia y ausencia del aceite esencial.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Resistencia múltiple a antimicrobianos

Existen numerosos tipos de fármacos, entre ellos, los más conocidos son: las vacunas, antidepresivos, antivirales, anestésicos, y antimicrobianos (Ashraf et al., 2021), estos últimos son compuestos de origen natural o sintético, capaces de inhibir el crecimiento y propagación de diversas clases de microorganismos sensibles e incluso, de destruirlos (Bhattacharjee, 2022). Los antibióticos son un tipo de antimicrobiano de origen natural, empleados en la prevención y tratamiento de infecciones causadas por bacterias. El objetivo de los antibióticos puede ser erradicar, inhibir el crecimiento, o eliminar el microorganismo patógeno. Sin embargo, el uso inadecuado de los antibióticos y la automedicación ha supuesto un grave problema de salud pública, debido a la adquisición de resistencia. La resistencia antimicrobiana, AMR (Anti-Microbial Resistance) hace referencia a la capacidad que poseen los microorganismos para disminuir su susceptibilidad frente a la acción de los antimicrobianos de una o más categorías, generando resistencia a estos (World Health Organization, 2023). La resistencia a múltiples antimicrobianos ocurre debido a que la bacteria en cuestión desarrolla mecanismos de supervivencia que impiden el mecanismo de acción del medicamento implicando una pérdida de la eficiencia y limitando las alternativas terapéuticas (Stower, 2020). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la AMR afecta la salud y la economía de los países, ya que incrementa los costos médicos, disminuye la productividad de las personas e incrementa la mortalidad (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Lamentablemente, la problemática generada por el incremento de la resistencia múltiple a los antibióticos ha sido responsabilidad directamente de los seres humanos, pues la falta de

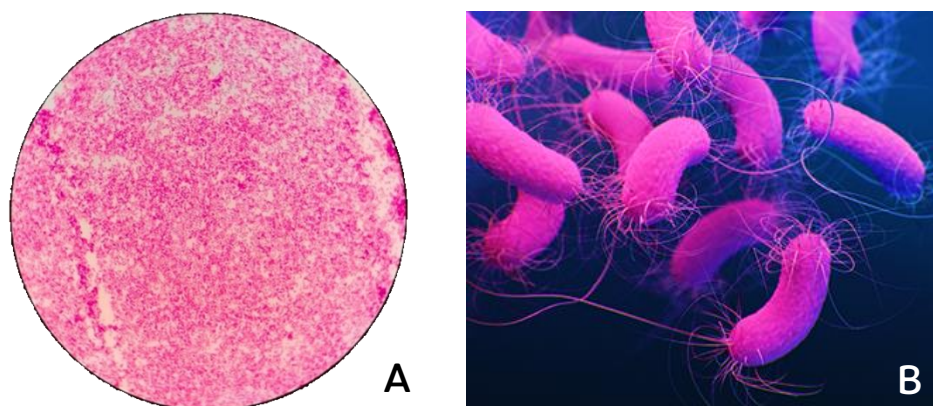
saneamiento y conciencia colectiva, la inadecuada prevención de infecciones, y fundamentalmente el uso indiscriminado de antibióticos en el mundo, tanto en humanos, animales y ecosistemas, han causado que el problema incremente de manera drástica (Saini et al., 2023). En la actualidad, las enfermedades infecciosas se han convertido en la principal causa de mortalidad en Estados Unidos, esto se debe a la resistencia de las bacterias a los antibióticos que ha ido en aumento con el paso del tiempo, generada cuando las bacterias mutan o adquieren genes de resistencia, lo que les permite sobrevivir y multiplicarse en presencia de un antibiótico que normalmente las mataría.

Cuando las bacterias se vuelven resistentes a los antibióticos, las infecciones que causan pueden ser más difíciles de tratar, requerir hospitalización más prolongada, aumentar el riesgo de complicaciones y ser más propensas a resultar en muerte (Bhattacharjee, 2022).

Por otro lado, el uso desmesurado de los antibióticos de mano con la automedicación, han incrementado la formación y esparcimiento de múltiples bacterias resistentes, generando amenazas mundiales a los tratamientos basados en el uso de los antibióticos, ocasionando que se realicen diferentes esfuerzos con el fin de generar nuevos compuestos antimicrobianos (M. Song et al., 2020; Yang et al., 2023).

## 2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* es un bacilo móvil, gramnegativo (Figura 1), clasificado como patógeno oportunista que participa en infecciones respiratorias, gastrointestinales, entre otras; las cuales incrementan significativamente la morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. Su temperatura de crecimiento óptima es de 37 °C, sin embargo, el crecimiento se puede dar hasta los 42 °C, sin necesidad de factores de crecimiento externo (Bennik, 1999).



**Figura 1.** A. Tinción de Gram de *P. aeruginosa* vista a 100 X en un microscopio de luz blanca. B. Micrografía electrónica de *P. aeruginosa*. Tomado de (CDC, 2019)

A lo largo del siglo XXI, este microorganismo ha sido de gran importancia en las infecciones hospitalarias, pues, al tratarse de un organismo metabólicamente versátil, con capacidad de desarrollarse en múltiples entornos, cuenta con gran cantidad de factores de virulencia asociados, que aportan en gran medida a su patogénesis (Morita et al., 2014). Su alto nivel de virulencia y la inmunidad adaptativa, provoca un amplio espectro de enfermedades respiratorias y nosocomiales, importantes para los pacientes con inmunodepresión (Bashir & Brown, 2022). Además de las infecciones respiratorias, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de infectar heridas, quemaduras, sitios quirúrgicos e incluso el tracto urinario, y bacteriemia, la cual puede llegar a convertirse en una sepsis mortal (Sanya et al., 2023).

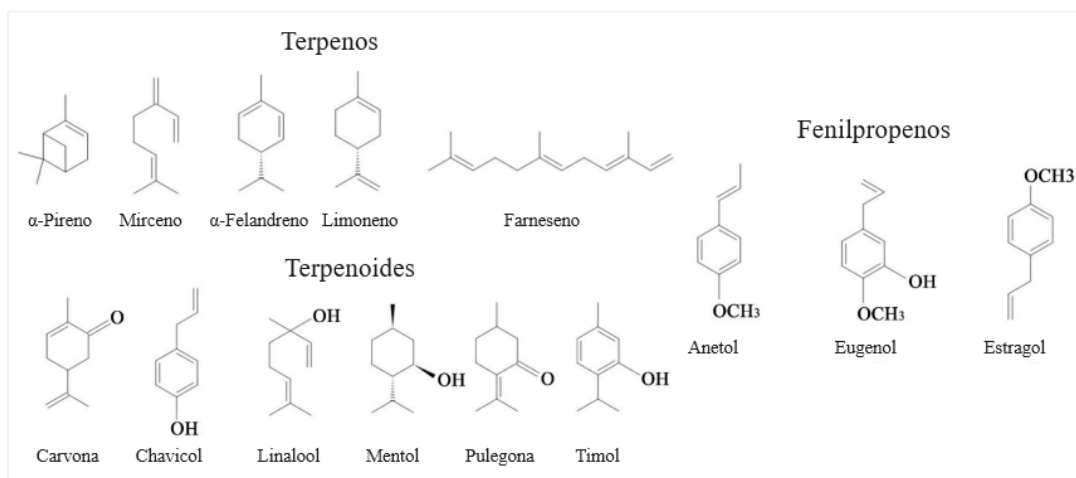
En el 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó su primer listado de “patógenos prioritarios”, un catálogo de 12 familias de bacterias que representan la mayor amenaza para la salud humana, en el cual se destaca particularmente la creciente advertencia de las bacterias gramnegativas, las cuales tienen habilidades incorporadas para encontrar nuevas formas de resistir tratamiento y tienen la capacidad de transmitir material genético que permita a otras bacterias desarrollar también multiresistencia; el listado de la OMS se divide en tres categorías según la urgencia de la necesidad de nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta y media. *P. aeruginosa* se encuentra en el segundo lugar de la categoría de prioridad crítica. Esto significa que esta bacteria representa una amenaza particular en hospitales, hogares de ancianos y entre pacientes que requieran dispositivos como ventiladores y catéteres de sangre (World Health Organization, 2017).

A pesar de que existen varios antibióticos con actividad microbiana frente a *P. aeruginosa*, este microorganismo ha desarrollado diferentes mecanismos de respuesta y resistencia a múltiples antibióticos orales e intravenosos (Bashir & Brown, 2022). Entre los mecanismos de resistencia se encuentran: disminución de la permeabilidad de membrana de la bacteria, producción de enzimas inactivadoras de antibióticos, modificaciones de diana en los antibióticos, mutaciones cromosómicas, entre otros, ocasionando que los tratamientos terapéuticos se hayan convertido en un fracaso (Bashir & Brown, 2022; Morita et al., 2014).

Por otro lado, *P. aeruginosa* puede producir la enzima metalo-betalactamasa (MBL). Las MBL son un tipo de enzima capaz de descomponer una amplia gama de antibióticos, incluyendo los carbapenémicos, que a menudo se utilizan como último recurso para tratar infecciones graves. Esto es especialmente preocupante porque estas bacterias pueden contener genes que les confieren resistencia a los antibióticos y estos genes pueden ser transferidos a otras bacterias a través de un proceso llamado transferencia horizontal de genes. (Neves et al., 2014).

### 2.3 Aceites esenciales bioactivos

Los AE son líquidos fragantes y volátiles de naturaleza compleja que, aunque representan una pequeña proporción en las plantas aromáticas, tienen un impacto significativo en la industria farmacéutica debido a las múltiples propiedades terapéuticas que poseen, como pueden ser: antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antivirales, analgésicas, neuroprotectoras y cardioprotectoras (Khan et al., 2023). Estos productos tienen un gran valor agregado debido a su origen natural, a su composición química obtenida a partir de los metabolitos secundarios presentes en las hojas, la corteza, las raíces y la madera de las plantas. Los AE son conocidos por sus ingredientes activos como los terpenos, fenilpropenos, compuestos alifáticos y otros componentes de menor alcance, como se muestra en la Figura 2. Estos compuestos le proporcionan características como el aroma, la actividad biológica y la amplia gama de usos y aplicaciones que estos pueden tener debido a la diversidad de sus componentes (Anjaly Shanker et al., 2023).



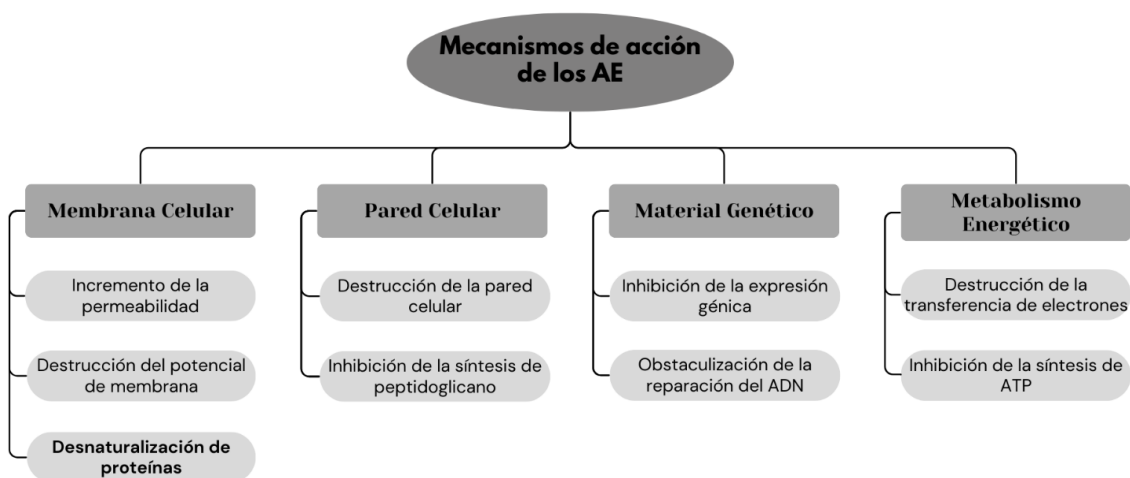
**Figura 2.** Principales compuestos químicos de los AE. Adaptado de: (Ni et al., 2021)

Los AE se distinguen por su amplia gama de beneficios biológicos y antimicrobianos, lo cual ha ocasionado que hayan sido empleados como remedios naturales durante más de mil años. Las propiedades de los AE han contribuido y despertado un creciente interés en su uso,

particularmente en los campos de la medicina y conservación de alimentos; adicionalmente estos componentes tienen la facilidad de ingresar al organismo por medio de diferentes vías de acceso, como la inhalación, la absorción cutánea y la ingestión (Mehdizadeh & Moghaddam, 2018).

Las propiedades biológicas de los AE pueden desempeñarse por medio de diferentes mecanismos de acción, tal como se puede observar en la Figura 3, en este proyecto de investigación, se analizaron algunos de estos mecanismos de acción, para ello, se empleó el aceite esencial de *Lippia origanoides*.

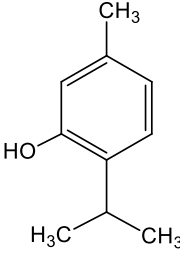
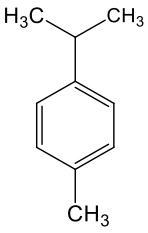
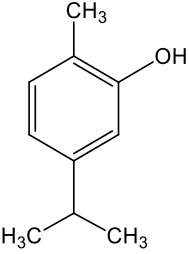
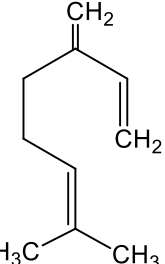
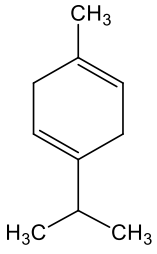
*Lippia origanoides*, es una planta perteneciente a la familia Verbenaceae; se caracteriza por crecer en los arbustos y ser muy aromática, su altura varía entre 0,7 y 2,5 metros, sus hojas son de forma ovalada, poseen una textura rugosa, están ligeramente cubiertas de vellosidades y tienen una longitud de 1 a 3 cm de largo y 0,5 a 1,5 de ancho; esta planta está constituida por numerosas flores pequeñas de color blanco, y sus frutos son pequeñas cápsulas secas, dentro de las cuales se pueden encontrar las semillas de color café (Pérez Santiago et al., 2011). Esta especie se distingue por la abundancia de sus aceites esenciales, los cuales son notables no solo por su cantidad, sino también por sus propiedades. Estos aceites esenciales exhiben características antibacterianas y antioxidantes, atributos que están intrínsecamente ligados a su composición química.



**Figura 3.** Mecanismos de acción de los AE en las células. Adaptado de: (Ni et al., 2021)

En un estudio llevado a cabo por la Universidad Industrial de Santander en el año 2023, se utilizó la técnica de cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC/MS) para analizar la composición del aceite esencial de *Lippia origanoides*. Los resultados revelaron la presencia de diez compuestos, que en conjunto representan el 95,5 % de la composición total del aceite. La Tabla 1 muestra los cinco compuestos principales que conforman la mayor parte del aceite (Ruiz-Duran et al., 2023).

**Tabla 1.** Principales componentes del AE de *Lippia origanoides*. Adaptado de: (Ruiz-Duran et al., 2023)

Nombre	Timol	<i>p</i> -cimeno	Carvacrol	$\beta$ -myrcene	$\gamma$ -terpineno
Estructura					
Concentración v/v	71,7 %	10,5 %	4,4 %	2,1 %	2,0 %

Los demás compuestos encontrados en el aceite fueron: óxido de cariofileno (1,6%), timil metil éter (0,9%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (0,9%), epóxido de humuleno II (0,7%) y terpinen-4-ol (0,7%).

Este aceite esencial es utilizado comúnmente en medicina tradicional, para el tratamiento de resfriados, infecciones pulmonares y gripe, estos usos alternos han causado que los científicos dedicados a tratar enfermedades infecciosas muestren interés en los compuestos biológicamente activos derivados de fuentes naturales con propiedades antibacterianas (dos Santos et al., 2004).

## 2.4 Proteómica como herramienta para el análisis de rutas metabólicas

Las ciencias ómicas son un grupo de disciplinas relacionadas entre sí que se enfocan en el estudio integral de un componente biológico dentro de un organismo. Cada una de estas disciplinas se dedican a investigar aspectos particulares de la biología molecular, aportando a una comprensión integral de la estructura y función de los sistemas biológicos. Las principales ciencias ómicas son la genómica (ADN), transcriptómica (ARN), metabolómica (Metabolitos) y **proteómica** (proteínas) (Hamers, 2016).

En conjunto, las ciencias ómicas proporcionan información puntual sobre procesos biológicos. Esta información se puede comparar entre sí para determinar las diferencias de los fundamentos biológicos de la salud y la enfermedad, o de tratamientos y controles, proporcionando así nuevos y más precisos métodos de predicción, prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Regan et al., 2019).

La proteómica, tal como su nombre lo sugiere, es el estudio del conjunto de proteínas expresadas por un organismo determinado, una célula, o un tejido, en un momento puntual y a condiciones específicas (proteoma). A grandes rasgos, la proteómica es el análisis completo de los proteomas a partir de la generalidad de su composición, estructura y actividad, empleando diversas metodologías de identificación y caracterización de las proteínas, las cuales son elementos fundamentales de los organismos vivos (Barallobre-Barreiro et al., 2013). La proteómica comparativa es una de las estrategias de análisis más utilizada para determinar proteínas que presentan variaciones como respuesta a un estímulo específico, sobreexpresándose o inhibiéndose (Malmström et al., 2013).

Únicamente mediante el estudio de las proteínas, es posible que sean identificadas las modificaciones postraduccionales, pues estas pueden afectar profundamente la función proteica en

una célula (Graves Paul R. & Haystead Timothy A. J., 2002). Esta disciplina científica es de vital importancia en investigaciones relacionadas con la salud. El conocimiento de las proteínas y moléculas encargadas de la función celular, así como la comprensión de cómo llevan a cabo sus funciones y cómo interactúan entre sí, permiten un mayor entendimiento de las funciones y mecanismos del sistema humano. Esto es crucial para entender los procesos biológicos normales y las alteraciones que ocurren en las enfermedades (Pando-Robles & Lanz-Mendoza, 2009).

Debido a la importancia de la proteómica, se han desarrollado herramientas universales que permiten separar las proteínas de los demás componentes celulares. Dos de las técnicas analíticas más eficientes que se complementan para obtener óptimamente la separación y la identificación de proteínas son electroforesis en gel 2D y la espectrometría de masas MALDI-TOF (Colino Palomino, 2021).

#### **2.4.1 Electroforesis bidimensional como método de separación de proteínas**

La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) es conocida por ser una de las técnicas más utilizadas para el estudio del proteoma de un sistema biológico. Los geles de electroforesis bidimensional aportan evidentes ventajas en la separación e identificación de múltiples especies de proteínas individuales (Meleady, 2023). En la electroforesis bidimensional, las proteínas son separadas en geles de poliacrilamida por medio de dos parámetros que no están relacionados entre sí, la carga (punto isoelectrico, pI) y el tamaño (peso molecular, MW). Esta técnica es considerada de alta resolución, gracias a que permite la separación de mezclas complejas de proteínas, la resolución de este método es distintiva gracias a su dimensionalidad, y el mejor resultado se obtiene cuando se combina el isoelectroenfoco (IEF) con la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Jungblut, 2006).

La técnica 2D-PAGE, separa las proteínas de manera que se generan spots de punto isoeléctrico y peso molecular específicos, los cuales se presume se encuentran asociados a una proteína en particular, de esta manera es posible detectar variaciones en las cantidades relativas de especies proteicas y así poder identificar diferencias entre muestras (Jungblut, 2006).

La técnica de electroforesis bidimensional es un método poderoso y versátil que cuenta con una amplia gama de aplicaciones en diversos campos, siendo especialmente relevante en el ámbito clínico. En el contexto de esta investigación, la técnica 2D-PAGE se utilizó con el objetivo de estudiar las proteínas características del microorganismo *P. aeruginosa*, por medio de la comparación de los geles de electroforesis obtenidos de muestras control con respecto a las muestras tratadas con el aceite esencial de *L. origanoides*.

La técnica 2D-PAGE separa las proteínas en función de su masa molecular y su punto isoeléctrico. Esto permite diferenciar entre proteínas de masa idéntica que difieren en su pI, así como proteínas con valores de pI similares, pero con masas moleculares distintas.

## 2.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF como técnica para identificación de proteínas

En los últimos años, la espectrometría de masas MALDI-TOF ha incursionado más que nunca en la investigación enfocada en proteínas. De hecho, la espectrometría de masas es actualmente la tecnología primordial y más eficiente utilizada para la identificación de proteínas en muestras de carácter biológico. Esta técnica se caracteriza por su sensibilidad, resolución y precisión. Proporciona análisis completos de proteínas en todo el proteoma, basándose en los cambios entre diferentes condiciones, como muestras biológicas sanas versus enfermas. Esto permite descubrir los mecanismos patológicos a nivel fenotípico del microorganismo estudiado (Blattmann & Aebersold, 2023; Rozanova et al., 2021; Zhang et al., 2024).

La técnica de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz - Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) es una técnica de ionización suave, que combina la ionización MALDI con la separación de iones por tiempo de vuelo (TOF). Esta técnica consta de cinco fases características:

1. Preparación de la Muestra: La muestra que se va a analizar se mezcla con una sustancia especial conocida como matriz. La matriz es generalmente una molécula orgánica pequeña que absorbe la luz ultravioleta. La muestra y la matriz se cristalizan juntas en un target de muestras (Schumann & Maier, 2014, p. 13).
2. Disparo del Láser: Un láser se dispara hacia el target de muestra. La matriz absorbe la energía del láser y se calienta rápidamente. Esto es importante porque la matriz actúa como un medio, transfiriendo energía del láser a la muestra sin destruirla. La matriz, formada por pequeñas moléculas ácidas, posee una alta capacidad de absorción óptica en el espectro de longitud de onda del láser empleado (Camarasa & Cobo, 2018).

3. Desorción e Ionización: El rápido calentamiento causa la desorción y la ionización de la muestra. La desorción se refiere al proceso en el que las moléculas de la muestra son liberadas de la superficie del target. Durante este proceso, las moléculas de la muestra también se ionizan (ganando o perdiendo electrones) debido a la transferencia de energía de la matriz.
4. Aceleración de los Iones y Tiempo de Vuelo: En MALDI-TOF, después de la ionización, los iones son acelerados por un campo eléctrico hacia un tubo de vuelo. Los iones de menor masa llegan al detector más rápido que los iones de mayor masa, debido a su mayor velocidad. Por lo tanto, el tiempo que tarda un ion en viajar desde el punto de ionización hasta el detector (el tiempo de vuelo) está inversamente relacionado con la raíz cuadrada de su masa. Esto permite la separación de los iones según su relación masa/carga (Giebel et al., 2010, p. 6).
5. Detección de los Iones: Los iones son detectados a medida que llegan al detector. La señal del detector se registra en función del tiempo de vuelo, produciendo un espectro de masas (Maldonado et al., 2018).

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se utiliza para identificar la cantidad y el tipo de compuestos químicos presentes en una muestra, midiendo la relación masa/carga y la abundancia. Este enfoque rutinario puede ser utilizado para cuantificar gran variedad de analitos, incluyendo moléculas pequeñas y péptidos. MALDI-TOF MS, proporciona ventajas en análisis biológico de analitos, esta técnica ofrece la capacidad de monitorear muestras con mayor rendimiento a un menor costo en comparación con otros métodos (Dilmetz et al., 2021).

### 2.5.1 Servidor MASCOT de Matrix Science

Las herramientas computacionales han permitido que la proteómica basada en espectrometría de masas aborde los desafíos relacionados con la eficiencia de ionización de analitos. A pesar de esto, el desarrollo de instrumentos integrados para el trabajo con datos de MS ha evolucionado de manera paulatina y fragmentada. Por consiguiente, el acceso a estas herramientas es limitado para ciertos sectores de la comunidad científica (Knudsen et al., 2014).

MASCOT es ampliamente reconocido en el campo de la proteómica como un motor esencial de búsqueda desarrollado por Matrix Science, que utiliza información de espectrometría de masas con el fin de identificar y caracterizar proteínas por medio de diferentes bases de datos de secuencias primarias. Su aplicación puede llegar a ser de gran utilidad para investigadores, laboratorios, educadores y para la industria en general.

MASCOT Server es un poderoso motor de búsqueda que se ha catalogado como el estándar en la identificación de proteínas, integrando todos los métodos estudiados en la búsqueda de bases de datos, entre ellos: huella de masa peptídica, consulta de secuencias y búsqueda de iones MS/MS (Matrix Science, 2023).

MASCOT Server dispone de varias bases de datos de secuencias, las cuales pueden consultarse según la especie que se esté analizando. En el contexto de esta investigación, se destacan dos bases de datos fundamentales para la búsqueda:

1. SwissProt: Es una de las bases de datos de proteínas con mayor calidad, es ideal en cuanto a búsquedas de huellas de masas peptídicas (Matrix Science, 2024).
2. Contaminants: Es una base de datos de contaminantes comunes compilada por el Instituto Max Planck de Bioquímica de Martinsried, evalúa y monitorea los riesgos asociados a sustancias que interfieren con proteínas de interés (Matrix Science, 2024).

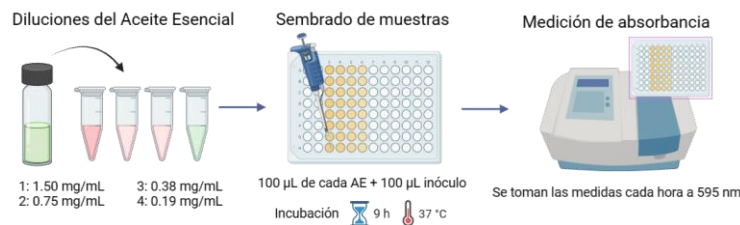
### 3. METODOLOGÍA

Este trabajo se llevó a cabo utilizando solventes de alta calidad analítica, incluyendo: acetonitrilo, isopropanol, metanol, entre otros, (Merck). Además, se emplearon otro tipo de reactivos, entre esos: urea, glutaraldehído, THPS, CHAPS, DTT y tripsina, todos adquiridos a Sigma Aldrich. Todas las soluciones se prepararon con agua tipo I libre de RNAasas, DNAasas y proteasas. El AE de *L. origanoides* quimiotipo timol (LOT-II), fue proporcionado por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agro-Industrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas Tropicales (CENIVAM). Todo el material de plástico y vidrio utilizado fue esterilizado en una autoclave de la marca All American, asegurando su uso exclusivo para experimentación proteómica.

Para la investigación se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853, adquirida comercialmente a LabCare de Colombia, la cual, según la ATCC, está diseñada únicamente para ser usada en laboratorios de investigación, nunca para uso terapéutico o diagnóstico animal o humano; este microorganismo se encuentra en estado liofilizado, con el fin de conservarlo y facilitar su transporte (*P. aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853). Esta investigación se llevó a cabo con una cepa de *P. aeruginosa* en estado planctónico, lo cual quiere decir que su interacción física con otras células es limitada, y se encuentra en un estado libre de flotación (Vohra et al., 2024).

### 3.1 Actividad antibacteriana de *L. origanoides* sobre *P. aeruginosa*

La determinación de actividad biológica se llevó a cabo mediante pruebas de inhibición de crecimiento, y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), de acuerdo con el protocolo del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007; Martínez et al., 2023) como se muestra en la Figura 4.



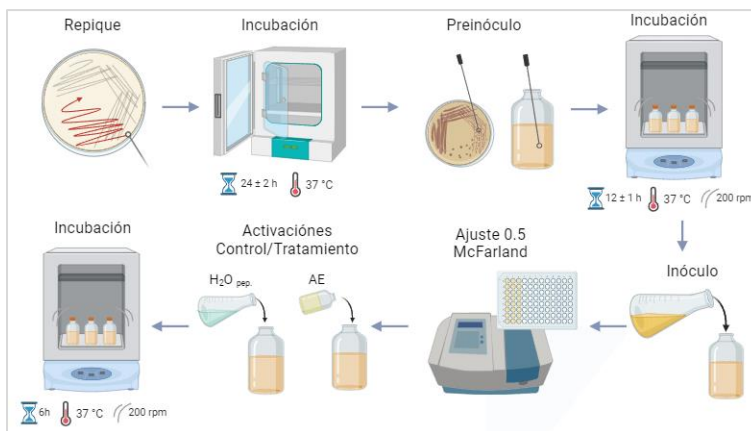
**Figura 4.** Procedimiento para actividad antimicrobiana de LOT-II sobre *P. aeruginosa*

El microorganismo se inoculó en caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) durante 16 h a 37 °C. A partir de este cultivo se preparó el inóculo fresco ajustando la concentración inicial a una densidad óptica (D.O) de 0,08-0,1 medido a 595 nm en el lector de microplacas Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher-Scientific, Waltham, MA, USA). Se prepararon cuatro diluciones del aceite esencial partiendo de una solución madre de 600 mg/mL. Para ello, primero se diluyó la solución hasta 3 mg/mL (30 µL AE + 5970 µL agua peptonada 0.1 % *m/v*). La primera dilución, de concentración 1.5 mg/mL se preparó mezclando volúmenes iguales de la solución inicial (3 mg/mL) y agua peptonada 0.1 % *m/v*. A partir de las soluciones obtenidas se realizaron diluciones sucesivas hasta obtener las concentraciones de 0.75 mg/mL, 0.375 mg/mL y 0.1875 mg/mL. En cada pozo de la microplaca se añadieron 100 µL de las diluciones del AE de *L. origanoides* y 100 µL de inóculo bacteriano y se homogenizó por retropipeteo. La microplaca se incubó durante 9 h a 37 °C realizando mediciones de absorbancia correspondientes al crecimiento bacteriano cada hora, utilizando el lector de microplacas a 595 nm.

Para los controles se utilizó una mezcla apropiada de DMSO < 1 %, medio de cultivo e inóculo como controles de crecimiento, y un control negativo de esterilidad con el medio de cultivo estéril y el AE. Como control positivo del efecto antimicrobiano se utilizó ofloxacina como antibiótico convencional. De esta forma se construyeron las cinéticas de crecimiento microbiano. La CMI fue la menor concentración (mg/mL) en la cual no se presentó crecimiento microbiano.

### 3.2 Obtención de la biomasa bacteriana de *P. aeruginosa*

Como se muestra en el esquema de la Figura 5, a partir de un cultivo en agar BHI fresco (Brain Heart Infusion), que se incubó durante 24 h, se preparó un preinóculo agregando una colonia del repique a 8-10 mL de medio Luria Bertani (LB) estéril y se dejó en incubación durante  $12 \pm 1$  h a  $37^\circ\text{C}$  en agitación constante a 200 rpm. Una vez finalizado el tiempo de cultivo, se preparó el inóculo, ajustando la concentración bacteriana a 0,5 McFarland, equivalente a  $1 - 5 \times 10^8$  UFC/mL (0,08 a 0,1 D.O. a 595 nm) utilizando medio de cultivo LB estéril. A partir de este inóculo se prepararon los cultivos planctónicos (tratamiento y control) utilizando una concentración subinhibitoria de LOT-II (0,375 mg/mL) y agua peptonada (0,1% *m/v*), respectivamente. Estos cultivos se incubaron durante 6 h a  $37^\circ\text{C}$  en agitación constante a 200 rpm posteriores a los cuales se realizó la extracción de proteínas totales. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.



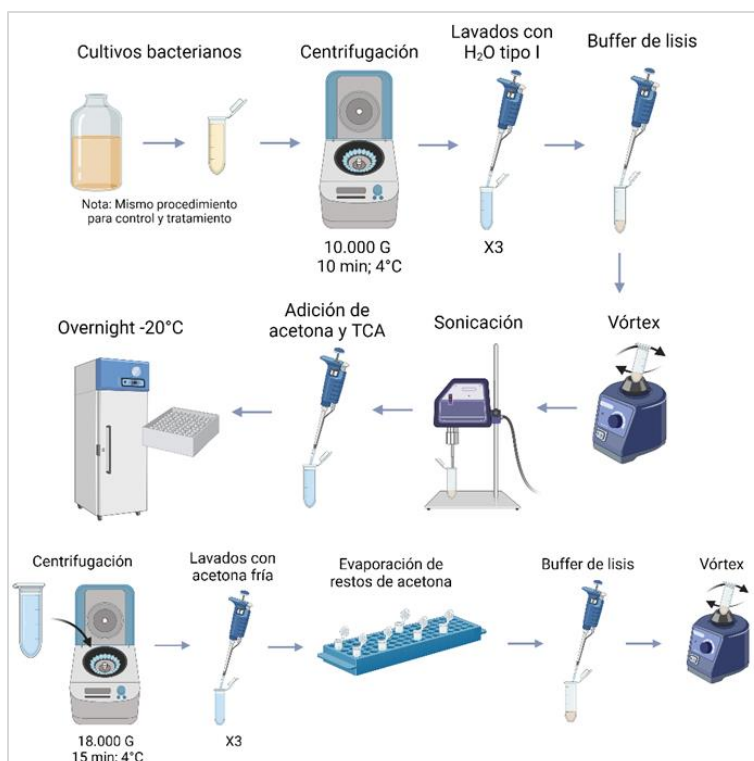
**Figura 5.** Procedimiento para la formación del pellet de *P. aeruginosa*

### 3.3 Extracción, precipitación y solubilización de proteínas

La Figura 6 ilustra el procedimiento realizado para extraer, precipitar y solubilizar las proteínas. Se centrifugaron los cultivos planctónicos a 10.000 G por 10 minutos a 4 °C, para recuperar el pellet de células bacterianas. Los pellets fueron lavados 3 veces con agua peptonada 0,1 % y centrifugando a 10.000 G por 10 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante. Una vez obtenido el pellet bacteriano, se le adicionaron 200 µL de buffer de lisis (Urea 7 M, Tiourea 2 M, DTT 100 mM, Tris 40 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, Ortovanadato de Sodio 1 mM, CHAPS 4 %, Anfólitos 1 %), se agitó en vórtex por 1 minuto.

La muestra se sometió a lisis mecánica utilizando un sonicador de punto al 50 % de la amplitud en 3 ciclos de 5 s on 55 s off, en baño frío de para evitar sobrecalentamiento. Una vez sonicada, se llevó a cabo la precipitación de proteínas, utilizando acetona fría (-20 °C), en una proporción de 1:8, y ácido tricloroacético (TCA) al 10 % v/v en proporción de 1:1, refrigerando por 12 h. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 18.000 G por 15 minutos a 4 °C, y se descartó el sobrenadante, se prosiguió a lavar el pellet de proteínas tres veces con acetona fría. Al finalizar los lavados, se procuró retirar la mayor cantidad de sobrenadante (acetona) que fuera posible, y se dejaron los tubos en la cabina de extracción a temperatura ambiente por unos minutos, para que la acetona restante se evaporara completamente.

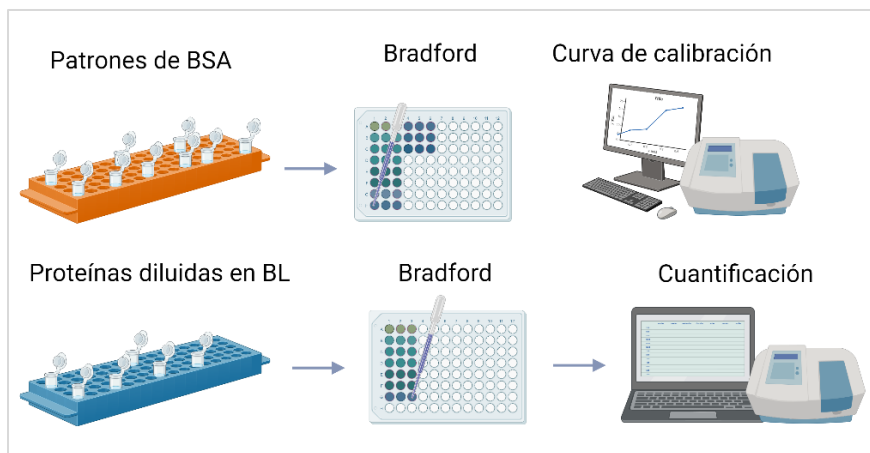
Finalmente se adicionaron 100 µL de buffer de lisis, y se resuspendió la proteína completamente con ayuda del vórtex, asegurándose de tener un sistema de enfriamiento que se mantenga a menos de 10 °C. Cuando la muestra estuvo completamente solubilizada, se prosiguió a cuantificar las proteínas con el método de Bradford.



**Figura 6.** Procedimiento para la extracción, precipitación y solubilización de proteínas

### 3.4 Cuantificación de proteínas

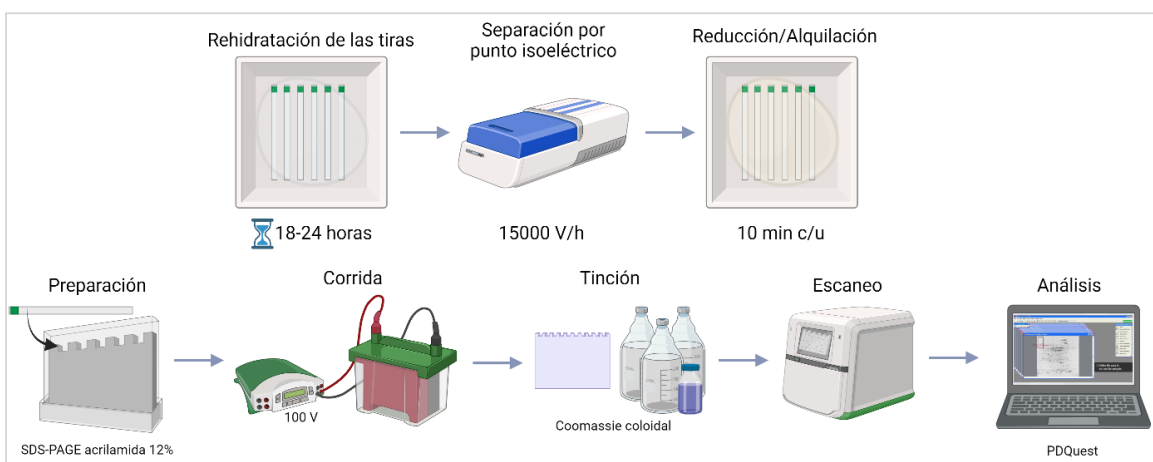
A partir de una curva de calibración se determinó la concentración de proteínas totales obtenidas para las muestras tratadas y control. Para ello se preparó una solución madre de 2 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA) y a partir de ella se hicieron diluciones para obtener diferentes concentraciones de patrón (se tomaron 10 concentraciones de BSA, 0,1 – 1,0 mg/mL). Para medir la absorbancia de cada patrón y de las muestras, se agregaron 5  $\mu$ L de cada muestra y 200  $\mu$ L de Reactivo Bradford (Etanol 5 % *v/v*, Coomassie 0,01 % *m/v* y Ácido Ortofosfórico 10 % *v/v*), por triplicado en una microplaca de 96 pozos, se dejó reposar 2 minutos (Tantray et al., 2023, p. 20). Se realizó la lectura en el lector de microplacas Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher-Scientific, Waltham, MA, USA) a 595 nm. Con los resultados de absorbancia obtenidos y la ecuación de la curva, se calcularon las concentraciones de las proteínas (Figura 7).



**Figura 7.** Procedimiento para la cuantificación de proteínas

### 3.5 Electroforesis bidimensional (2D)

La técnica que se utilizó para el análisis por electroforesis fue la descrita por O'Farrell (O'Farrell, 1975). Se utilizó un gradiente de pH inmovilizado de 3-10 no lineal de 7 cm, seguida de una separación por peso molecular en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de 12 % (Figura 8).



**Figura 8.** Procedimiento para la separación de proteínas en gel de electroforesis 2D-PAGE

#### 3.5.1 Para primera dimensión (Enfoque isoeléctrico)

Se utilizó el equipo PROTEAN® i12™ IEF System (Bio-Rad, USA) para separar las proteínas por punto isoeléctrico, en tiras de gradiente de pH inmovilizado-no lineales de 7 cm y pH 3 – 10, rehidratadas una solución que contenía urea 8 M, CHAPS 2 % *m/v*, DTT 50 mM,

anfolitos 0,2 % *m/v* y azul de bromofenol 0,001 % *m/v* durante un periodo de 18 – 24 horas. Posteriormente se colocaron las tiras en el equipo, utilizando el protocolo sugerido por BioRad, llevando hasta un voltaje de 15.000 V/h durante un periodo de 6 – 8 horas (Arizmendi et al., 2013).

### **3.5.2 Para segunda dimensión (SDS-PAGE)**

Una vez finalizado el proceso de isoelectroenfoque, se continuó con la fase de equilibrado de las tiras. Inicialmente las tiras se colocaron en una solución de equilibración I (DTT al 2 % *m/v*, urea 6 M, tris-HCl 0,375 M pH 8,8, SDS al 2 % *m/v*, glicerol al 20 % *v/v*) incubando por 10 min, 50 rpm y en oscuridad. Posteriormente, se transfirieron a la solución de equilibración II (iodoacetamida al 2 % *m/v*, urea 6 M, tris-HCl 0,375 M pH 8,8, SDS al 2 % *m/v*, glicerol al 20 % *v/v*) y se incubaron durante 10 min, 50 rpm y en oscuridad.

Posterior al proceso de equilibración se prosiguió a separar las proteínas de acuerdo con su peso molecular usando un gel de SDS-PAGE al 12 % de acrilamida con un programa de corrida de 2 h a 100 V. Para la generación del campo eléctrico y migración electroforética se utilizó un buffer de corrida (Glicina 1,44 % *v/v*, Tris-base 0,2 % *v/v*, SDS 0,1 % *v/v*). Una vez finalizada la corrida, los geles se tiñeron mediante el método de Commassie Coloidal (Arizmendi et al., 2013).

### **3.6 Lectura y análisis de imágenes**

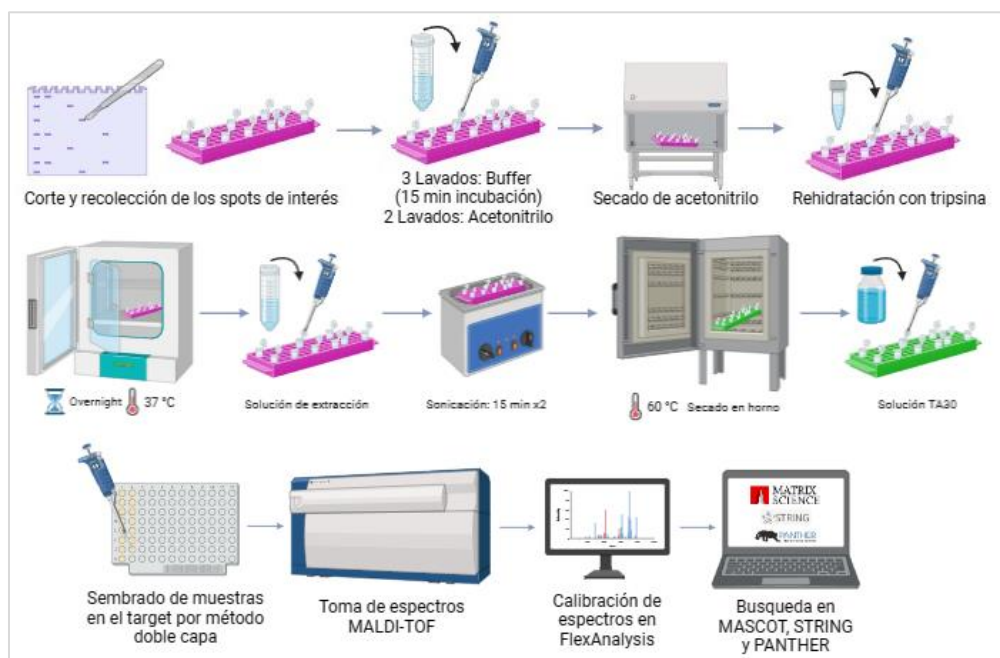
Una vez finalizada la electroforesis, los geles se escanearon a través de un fotodocumentador ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad, USA), y posteriormente se realizó el correspondiente análisis de imágenes con software PDQuest 2D (Bio-Rad). La expresión proteica de *P. aeruginosa* tratada con LOT-II se sometió a una evaluación estadística con las réplicas de control para detectar la expresión diferencial de proteínas. Los puntos de expresión diferencial son aquellos que mostraron variación biológica o *fold change FC* superando el umbral ( $2 \leq FC \leq 0,5$ ).

### 3.7 Identificación de proteínas diferenciales

Se utilizó la espectrometría de masas MALDI-TOF para el análisis de las moléculas biológicas, como se puede observar en la Figura 9. Cada gel se lavó con agua desionizada durante 10 minutos (3 veces). Se cortaron del gel de electroforesis, los spots de interés y se colectaron en tubos Eppendorf de 0,5 mL; se decoloraron con 200  $\mu$ L de buffer de lavado (acetonitrilo 50 % *v/v* y bicarbonato de amonio 50 mM), haciendo lavados de 15 minutos. Finalmente, los geles con los spots de interés se deshidrataron realizando dos lavados de 15 minutos con 200  $\mu$ L de acetonitrilo (grado analítico). La tripsinización se realizó agregando 7  $\mu$ L de la solución de rehidratación de tripsina 20 ng/ $\mu$ L (Modified Trypsin Porcine, Promega, USA) disuelta en bicarbonato de amonio 10 mM, incubando a 37 °C overnight. Para la extracción de proteínas, se agregaron 7  $\mu$ L de solución de extracción (60 % acetonitrilo, 1 % ácido trifluoroacético (TFA)), y se recolectó el sobrenadante (2 veces). Las muestras fueron concentradas a 60 °C en el Horno de secado (Binder, Alemania) y se resuspendieron en 5  $\mu$ L de solución TA30 (30 % acetonitrilo, 0,1 % TFA).

Para el análisis en MALD-TOF se preparó una solución saturada (20 mg/mL) de matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, Sigma-Aldrich), diluida en TA30. Los péptidos que se obtuvieron se colocaron en un plato de muestras, también conocido como target, (Plate MTP 384, Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania). se utilizó el método de doble capa, que implicó los siguientes pasos: inicialmente, se depositó 1  $\mu$ L de la matriz en los pocillos del target. Posteriormente, se añadió 1  $\mu$ l de la muestra concentrada a los pocillos. Para finalizar la preparación de la doble capa, se añadió una capa adicional de 1  $\mu$ l de matriz. Cada capa se dejó secar completamente a temperatura ambiente antes de proceder a la siguiente (Zárate et al., 2014). Se midieron los espectros de masas en el equipo de MALDI-TOF Ultraflextreme (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) operado con el software FlexControl v.33 y equipado con un láser

pulsado de Nd:YAG de 633 nm. Todo el conjunto de espectros de masas fue adquirido en modo lineal de iones positivos a una potencia de láser del 100 % en un rango de masas de 600 a 5000 kDa. El voltaje de aceleración entre las placas fue de 23kV con una frecuencia de 500 Hz y resolución de 40.000 FWH. La calibración externa se realizó utilizando un Mix de Péptidos Calibrantes MALDI-MS (Sigma Aldrich) en rango de 500 a 3500 Da. Cada espectro correspondió a la sumatoria de aproximadamente 10 disparos a la muestra realizados de forma manual para mejorar la relación señal/ruido (S/N). Los patrones de fragmentación que se obtuvieron fueron posteriormente comparados con los de las proteínas que se encuentran en la base de datos MASCOT para *P. aeruginosa*, procurando obtener un score representativo. El score es una medida que se utiliza para evaluar la significancia de los resultados de búsqueda. Se considera que los puntajes superiores a 40 son aceptables para identificar proteínas o péptidos. Sin embargo, esto puede variar según la calidad de los datos (Matrix Science, 2024). Además, se realizó una búsqueda en el recurso universal de UniProt para obtener información más detallada sobre las proteínas identificadas (Bowler-Barnett et al., 2023).



**Figura 9.** Procedimiento para la identificación de proteínas diferenciales

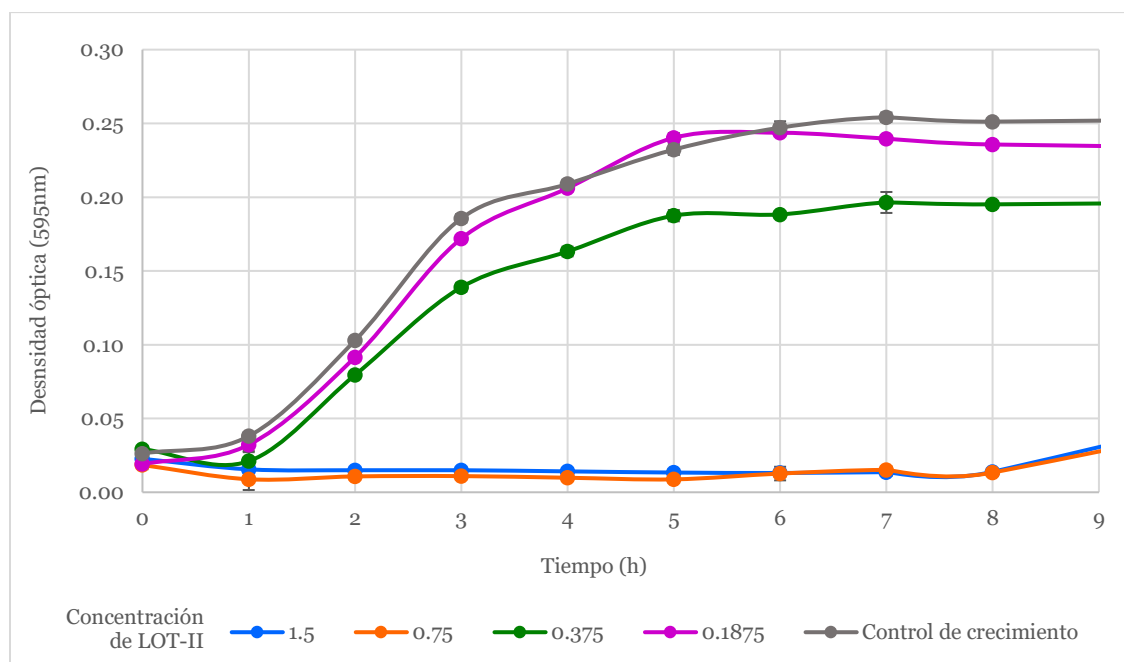
### 3.8 Análisis bioinformático

Se diseñó un interactoma utilizando el software STRING (<https://string-db.org/>) con el objetivo de evaluar de manera estadística las funciones biológicas asociadas a cada proteína y sus rutas interconectadas. Las proteínas que mostraron una expresión diferencial se agruparon según los términos de ontología génica (GO) relacionados con su función biológica y molecular. Además, se importó una lista de genes a PANTHER (<https://www.pantherdb.org/>) para un análisis más detallado. El interactoma proporciona una visión global de las interacciones proteína-proteína y ayuda a comprender mejor las funciones biológicas y las vías asociadas en un contexto molecular. PANTHER, por su parte, permite clasificar las proteínas según su función genética específica (Vennou et al., 2020).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Actividad biológica de *L. origanoides* sobre la expresión de *P. aeruginosa*

Se evaluó la actividad antimicrobiana del AE LOT-II en concentraciones de 0,19 a 1,5 mg/mL frente a *P. aeruginosa* para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la técnica de microdilución en caldo. Los resultados, que se presentan en la Figura 10, indican que la concentración mínima inhibitoria  $90$  corresponde a 0,75 mg/mL. Adicionalmente, a la mitad de la CMI $90$ , el efecto inhibitorio del LOT-II disminuye aproximadamente al 20 %, permitiendo el crecimiento parcial del microorganismo. Por lo tanto, se trabajó con una concentración de LOT-II de 0,38 mg/mL ( $\frac{1}{2}$  CMI $90$ ), ya que se requiere suficiente biomasa de *P. aeruginosa* para analizar el comportamiento del proteoma, manteniendo el efecto inhibitorio.



**Figura 10.** Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* durante exposición a diferentes concentraciones de AE de LOT-II

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia origanoides* (LOT-II) ha sido el foco de numerosas investigaciones, y se ha sugerido que puede estar vinculada a sus componentes principales, como el timol; el cual posee propiedades antibacterianas intrínsecas significativas contra una variedad de microorganismos, tanto gramnegativos como grampositivos (Wu et al., 2023). El mecanismo de acción de los principales compuestos de LOT-II se atribuye a su interacción con la membrana bacteriana. Se cree que estos compuestos desestabilizan la bicapa lipídica de la membrana bacteriana, lo que resulta en una mayor permeabilidad y eventual lisis de la célula (Muñoz et al., 2007). La eficacia del AE de LOT-II como agente antimicrobiano puede ser el resultado de la acción sinérgica de varios de sus componentes (Gomes dos Santos et al., 2023; Oliveira et al., 2007).

#### **4.2 Cuantificación de Proteínas por el método de Bradford**

Las proteínas contenidas en la biomasa del microorganismo *P. aeruginosa* fueron cuantificadas utilizando la técnica colorimétrica de Bradford. Para este propósito, se elaboró una curva de calibración con patrones BSA, la cual se detalla en el APÉNDICE A.

A partir de esta curva, se derivó la Ecuación (1), la cual representa la expresión algebraica de la recta. Esta ecuación se utilizó para determinar la concentración de proteínas.

$$y = 0,5532x - 0,0064 \quad (1)$$

Los resultados obtenidos se registraron en la Tabla 2; la cual evidencia que, tal lo han sugerido otros autores, se observó una disminución en la concentración del proteoma tratado con el AE de LOT-II, la cual puede tener implicaciones significativas en la supervivencia de *P. aeruginosa*, sugiriendo que este AE puede tener potencial como agente antimicrobiano (Abrahim et al., 2024; Adolpho et al., 2024; Ickovski et al., 2024).

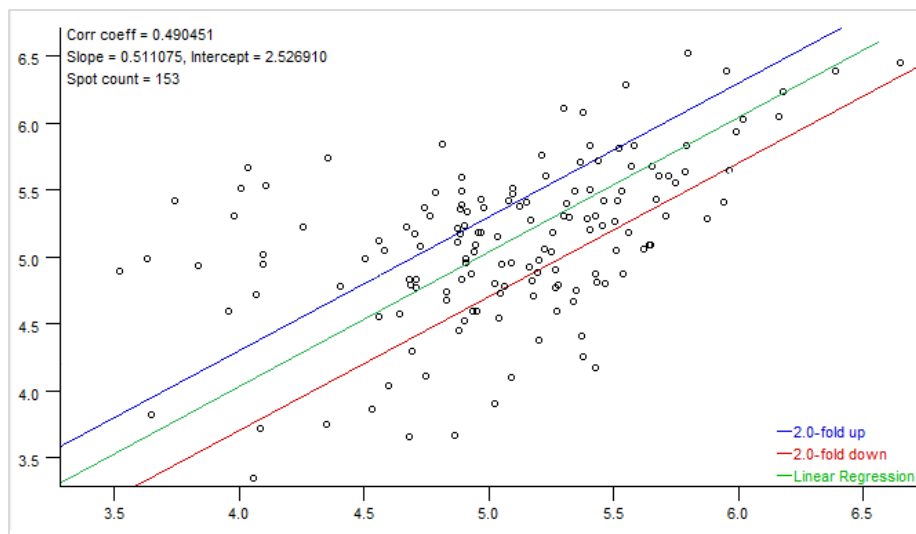
**Tabla 2.** Concentración de las proteínas extraídas de *P. aeruginosa*

Muestra	Absorbancia	Concentración de proteínas diluidas [Pr]	Concentración de proteínas final [Pr*dilución]	Concentración de proteínas promedio [Pr]	SD (Desviación estándar)
Control	0,094	0,181	3,63	3,37	0,64
	0,099	0,192	3,84		
	0,067	0,132	2,63		
Tratamiento	0,064	0,127	2,55	2,61	0,12
	0,069	0,138	2,76		
	0,064	0,127	2,53		

### 4.3 Análisis de proteínas de *P. aeruginosa* expresadas diferencialmente

Para determinar los cambios en la expresión proteica de *P. aeruginosa* inducida por el tratamiento con concentraciones sub-inhedoras del AE LOT-II, se realizaron los análisis del proteoma a través de electroforesis bidimensional de las proteínas obtenidas (Sección 4.2).

En la Figura 11 se presenta un diagrama de dispersión que permite visualizar la relación entre las réplicas de los geles de control y de tratamiento. En este gráfico, los puntos que se encuentran por encima de la línea azul, denominada “fold up”, representan las proteínas que tuvieron un aumento en su expresión después del tratamiento (sobreexpresadas). Por otro lado, los puntos que se ubican por debajo de la línea roja, conocida como “fold down”, indican las proteínas que presentaron una disminución en su expresión (inhibidas). Finalmente, los puntos situados entre ambas líneas representan las proteínas que no presentaron expresión diferencial significativa.

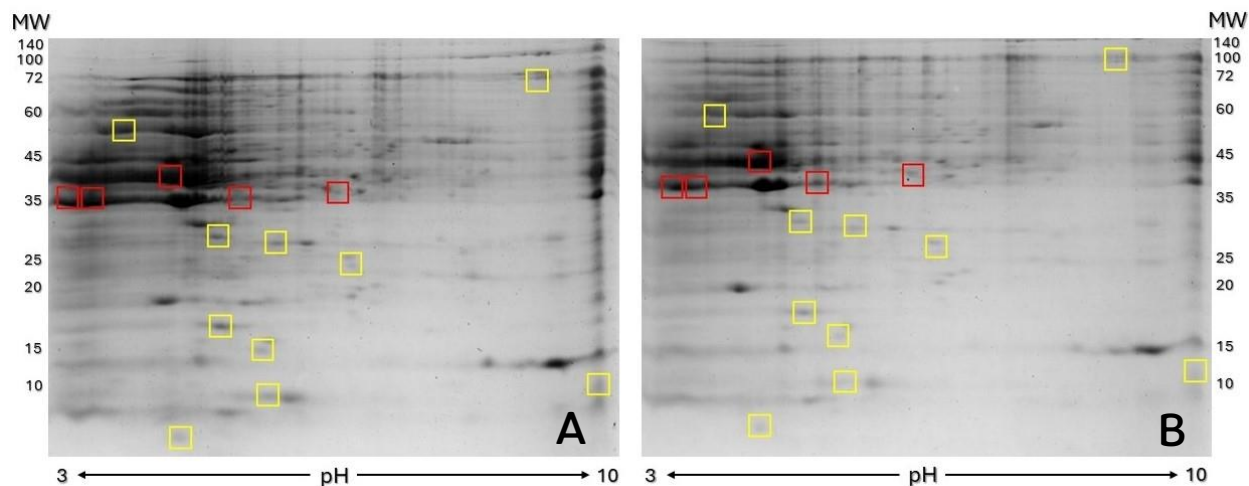


**Figura 11.** Diagrama de dispersión: Relación entre densidad de píxel de los controles vs tratamientos

En la Figura 12 se muestran dos geles representativos, una para el control (Fig. 12A) y otra para el tratamiento (Fig. 12B). A grandes rasgos, se puede observar que existe una amplia distribución de proteínas a lo largo del gel en ambas condiciones. Sin embargo, hay una mayor cantidad de spots en las áreas correspondientes a peso molecular superior a 50 kDa y pI ácido.

Los geles obtenidos presentan coincidencias con diversas investigaciones realizadas con anterioridad para este microorganismo. Con base con estos estudios previos, es consistente los resultados encontrados aquí con los reportados para este microorganismo, para el cual, es característico encontrar la mayoría de las separaciones en la región ácida y de alto peso molecular. (Balasubramanian et al., 2016; Iwański & Andrejko, 2023; Molina-Mora et al., 2022).

En los geles de control se encontraron en promedio 254 spots, y 236 en las muestras tratadas, de los cuales se consiguió emparejar un total de 186 spots. De estos, se identificaron 46 con expresión diferencial, de los cuales, los 15 más representativos se señalan en la Figura 12. Los spots que se encontraban sobreexpresados están indicados con cuadros de color rojo, mientras que los que cuya expresión fue inhibida se señalan con cuadros amarillos.



**Figura 12.** Geles 2D-PAGE representativos de control y tratamiento con LOT-II de *P. aeruginosa*  
**A.** Proteoma sin tratamiento (control) **B.** Proteoma con exposición (tratamiento) del aceite esencial LOT-II

Teniendo en cuenta que la cantidad de spots identificados en cada gel fue considerablemente alta, se puede inferir que el número de proteínas con expresión diferencial fue bajo. Esta observación podría estar correlacionada con la posibilidad de que el aceite esencial LOT-II, a una concentración de 0,38 mg/mL, tiene un efecto mínimo sobre *P. aeruginosa*, lo que resultaría insuficiente para generar cambios significativos en la expresión proteica.

Como se evidenció en la gráfica de actividad antimicrobiana (Sección 4.1) la concentración de 0,38 mg/mL tiene un efecto muy reducido sobre el crecimiento bacteriano (20 % de reducción en la tasa de crecimiento). A pesar de estas condiciones, se lograron identificar proteínas con expresión diferencial. Por lo tanto, es probable que, al realizar el tratamiento con una concentración mayor del aceite, se afecte de manera más significativa la intensidad de la respuesta proteica de *P. aeruginosa*. Sin embargo, esto afectaría también la cantidad de biomasa obtenida para el estudio.

Para el análisis de los geles, se consideraron ciertos parámetros. Los spots debían estar presentes en los triplicados y mostrar un *Fold Change*, o menor a 0,5 ( $2 \leq FC \leq 0,5$ ). Un FC mayor a 2 ( $\log_2(FC) > 1$ ) se considera una activación de la expresión proteica, mientras que un FC menor

a 0,5 ( $\log_2(FC) < -1$ ) se considera una represión. Estos valores indican que la expresión ha cambiado al menos dos veces en comparación con la condición de control (Cañizares, 2010).

En la Tabla 3 se presentan los spots diferenciales identificados, de los cuales cinco estuvieron sobreexpresados y otros diez inhibidos. Este patrón de expresión proporciona una visión detallada de los cambios metabólicos y de señalización que ocurren en respuesta al tratamiento. Para cada spot se registra también su respectivo valor de *Fold Change*. Los valores obtenidos en este estudio fueron consistentes con los hallazgos de investigaciones previas, donde las proteínas diferencialmente expresadas exhibieron valores de *Fold Change* dentro del mismo rango (Kim et al., 2018; Mada et al., 2019; Zhu et al., 2022).

**Tabla 3.** Spots que presentaron inhibición o sobreexpresión de proteína al someterse a tratamiento

<b>SSP<sup>††</sup></b>	<b>DSN promedio Control</b>	<b>DSN promedio Tratamiento<sup>‡‡</sup></b>	<b><i>Fold Change</i></b>
0621	1071820	2466533	2,301
0622	687821	1945868,33	2,829
1623	559950	1523806,5	2,721
2530	476952	1279068	2,682
4507	166709,67	399509,33	2,396
0222	1267595,4	234769,9	0,185
0620	2038198,77	936627,1	0,460
0810	604622,67	263867,67	0,436
1127	1638133	60058,67	0,037
1818	970064,3	298819,1	0,308
2317	1301164	487301,67	0,375
2531	764574	209864	0,274
3213	208279	91934,33	0,441
3325	318913,4	82944	0,260
9221	766277,67	66819,33	0,087

<sup>††</sup> **SSP:** Número de spot (Asignado por el software PDQuest)

<sup>‡‡</sup> **DSN:** Densidad de Píxel de cada spot

#### 4.4 Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF utilizando las herramientas de búsqueda MASCOT y UniProt

De los quince spots identificados con expresión diferencial en la Sección 4.3, se lograron caracterizar a nueve mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Tres de estos spots están asociados con la sobreexpresión del proteoma (Tabla 4), y los otros seis, con su inhibición (Tabla 5). Se documentaron tanto el punto isoeléctrico como el peso molecular de cada spot, datos proporcionados por MASCOT. Se aseguró que estos valores coincidieran con los resultados obtenidos de los geles.

**Tabla 4.** Proteínas de *P. aeuriginosa* sobreexpresadas con el tratamiento con LOT-II

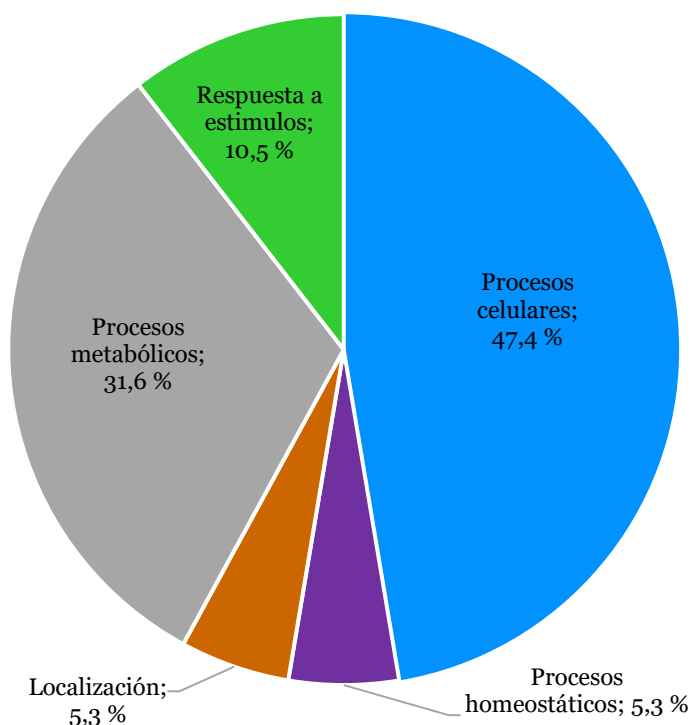
Spot	Proteína	Gen	Función molecular	Procesos biológicos	pI MW	Fold Change	Score
<b>SSP 0621</b>	ARNt-citidina(32) 2-sulfurtransferasa	ttcA	Cataliza la 2-tiolación (ATP) de la citidina en la posición 32 del ARNt, forma 2-tiocitidina	Modificación del ARNt	6,02 34200	2,3	71
<b>SSP 1623</b>	Patl_2273 hidroxilasa tipo PKHD	piuC	Actividad dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato Unión de Iones Hierro y de ácido L-ascórbico	Dioxigenasa Oxidoreductasa	7,85 25374	2,7	63
<b>SSP 2530</b>	Pantotenato sintetasa	panC	Cataliza la condensación de pantoato con beta-alanina en una reacción dependiente de ATP a través del pantoil-adenilato Fijación de ATP	Proceso biosintético de pantotenato	5,13 30588	2,7	43
<b>SSP 3503</b>	Proteína de biosíntesis del alginato	algF	Forma un complejo de membrana interna que probablemente interactúa con el complejo de polimerización-transporte de alginato y agrega grupos acetilo en las posiciones O-2 y O-3 de los residuos de manuronato.	Proceso biosintético del ácido algínico	9,47 22934	2,9	56

**Tabla 5.** Proteínas de *P. aeruginosa* inhibidas diferencialmente con el tratamiento con LOT-II

Spot	Proteína	Gen	Función molecular	Procesos biológicos	pI MW	Fold Change	Score
<b>SSP 0222</b>	Factor de reciclaje de ribosomas	frr	Responsable de la liberación de ribosomas del ARNm al final de la biosíntesis de proteínas Aumenta la eficiencia de la traducción mediante el reciclaje de ribosomas de una ronda de traducción a otra	Terminación traslacional	6,77 20188	0,185	57
<b>SSP 0620</b>	NADH-quinona oxidoreductasa subunidad C	nuoC	Enlace de NAD Actividad de la NADH deshidrogenasa Unión de Quinona	Acoplo de la reacción redox a la translocación de protones	5,13 23841	0,460	54
<b>SSP 0810</b>	Subunidad pequeña de la metiltransferasa G del ARN ribosómico	gidB	Metila la posición N7 de la guanina en la posición 527 del ARNr	Actividad del ARNr (guanina-N7)-metiltransferasa	9,23 22992	0,436	60
<b>SSP 1127</b>	Proteína bL12 de la subunidad ribosómica grande	rpIL	Ayuda al ribosoma a interactuar con los factores de traducción unidos a GTP	Traducción	4,62 12897	0,037	48
<b>SSP 1818</b>	Proteína uL30 de la subunidad ribosómica grande	rpmD	Constituyente estructural del ribosoma	Traducción	10,59 6540	0,308	50
<b>SSP 2317</b>	Factor de elongación P	efp	Síntesis de enlaces peptídicos Estímulo de la traducción eficiente y la síntesis de enlaces peptídicos en ribosomas	Biosíntesis de proteínas Elongación de la cadena polipeptídica	4,86 21222	0,375	50
<b>SSP 2531</b>	Ribonucleasa HII	rnhB	Endonucleasa que degrada el ARN Unión de iones de manganeso y de ARN Actividad de la ribonucleasa ARN-ADN	Replicación del ADN, eliminación del cebador de ARN Reparación de desajustes	8,22 31030	0,274	57
<b>SSP 3325</b>	Ribonucleasa HI	rnhA	Endonucleasa que degrada el ARN Unión de iones de manganeso y de ácidos nucleicos Actividad de la ribonucleasa ARN-ADN	Replicación del ADN, eliminación del cebador de ARN	9,12 17725	0,261	43

#### 4.5 Análisis bioinformático mediante PANTHER y STRING

El estudio de la ontología génica, realizado en PANTHER, evidenció los procesos biológicos asociados a las proteínas identificadas de *P. aeruginosa* que se sobreexpresaron o inhibieron durante el tratamiento con el AE de *L. origanoides* LOT-II. La Figura 13 ofrece una representación visual de los resultados obtenidos.



**Figura 13.** Procesos biológicos en los que están involucradas las proteínas diferenciales de *P. aeruginosa* expresadas en respuesta al tratamiento con el AE LOT-II. Construido en: PANTHER

El gráfico presentado en la Figura 13 demuestra que el 47,4 % de las proteínas se relacionan con procesos celulares esenciales para la vida, integridad y funcionamiento del organismo. Algunos de los procesos celulares que se pueden ver afectados son:

1. Apoptosis: El estrés oxidativo causado por el AE de LOT-II afecta la viabilidad del microorganismo, desencadenando en la muerte celular programada de *P. aeruginosa*.

Además, algunos de los componentes del AE, tienen la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno, también relacionadas con la apoptosis (Paz-Zarza et al., 2019; Tang et al., 2020).

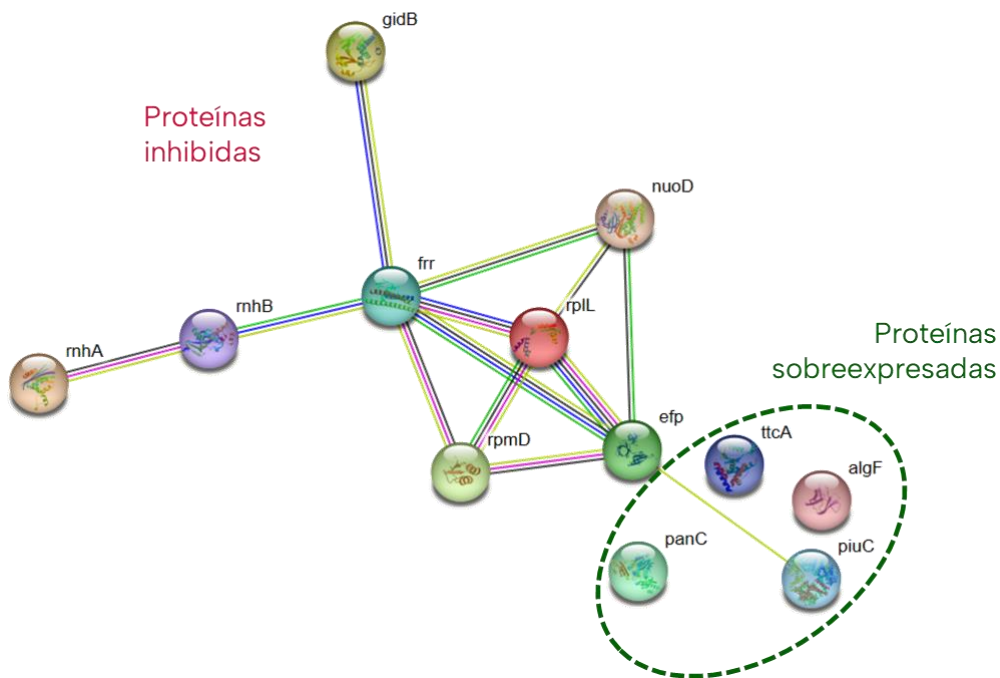
2. Permeabilidad de la membrana celular: La permeabilidad de la membrana celular puede verse afectada por el aceite esencial debido a su capacidad para disolverse en lípidos. Sus compuestos lipofílicos, entran en contacto con los lípidos de la membrana y alteran su estructura, afectando la fluidez para la entrada y salida de sustancias. La permeabilidad de la membrana celular puede aumentar en presencia del aceite esencial, provocando fuga de proteínas y enzimas celulares hacia el exterior, o que ciertas sustancias como iones y moléculas pequeñas atraviesen la membrana con facilidad. Esto, a su vez, podría influir en la supervivencia de la bacteria (Sin et al., 2021; Tang et al., 2020).
3. Comunicación intercelular (Quorum Sensing): Algunos componentes del AE de LOT-II tienen la capacidad de enlazarse con los receptores de la AHL (N-acil homoserina lactona), impidiendo de esta manera que las células de la bacteria detecten las señales de sus vecinas, e incluso, el AE puede tener la capacidad de intervenir en la síntesis de AHL (Cáceres et al., 2020; Martínez Guarnizo, 2019).
4. Transporte de nutrientes: Al verse alterada la permeabilidad de la membrana, también puede estar afectándose el transporte de nutrientes hacia la célula (BioBook, 2021). El aceite esencial puede inhibir o estimular la actividad de transportadores celulares específicos, como proteínas de transporte de iones y nutrientes (Maurya et al., 2021)

Otro 31,6 % de las proteínas identificadas participa en los procesos metabólicos, relacionados al suministro energético celular, tales como:

1. Metabolismo del nitrógeno: *P. aeruginosa* utiliza el amonio como fuente de nitrógeno. La enzima Glutamina Sintetasa (GS) convierte el amonio en glutamina y la Glutamato Sintetasa (GOGAT) transforma la glutamina en glutamato, compuesto que se utiliza en la síntesis de aminoácidos. Los compuestos volátiles del AE pueden inhibir o estimular la actividad de las enzimas GS y GOGAT alterando la conversión del amonio en glutamina y glutamato (Díaz Gadea, 2011).
2. Metabolismo de azúcares:
  - 2.1. Glucólisis: El AE de LOT-II puede estar involucrado en la actividad de las enzimas involucradas en la vía central de la degradación de azúcares (Rojas et al., 2006).
  - 2.2. Ciclo de Krebs: Las proteínas expresadas diferencialmente están probablemente asociadas con la generación de energía, la síntesis de precursores metabólicos y la producción de nucleótidos.
3. Metabolismo de aminoácidos: El microorganismo *P. aeruginosa* tiene la capacidad de sintetizar sus propios aminoácidos, los cuales son esenciales para la producción de proteínas. Además, también se realiza la desaminación oxidativa de los aminoácidos, proceso crucial para el reciclaje de nitrógeno y la obtención de energía. Estos procesos se pueden ver alterados con la expresión diferencial de las enzimas que participan en estas reacciones (Sosa Escudero, 2019).

Un 10,5 % adicional está relacionado con la respuesta a estímulos, capacidad fundamental para la supervivencia del organismo. Finalmente, el 5,3 %, está asociada a procesos de localización, que pueden influir en la patogenicidad del organismo, y otro 5,3 % está implicada en procesos homeostáticos, influyentes en la resistencia a cambios con el fin de mantener un equilibrio interno estable (Martínez et al., 2023).

Mediante el uso de la herramienta de búsqueda STRING, se generó una red de interacciones entre las proteínas identificadas en la Sección 4.4, las cuales mostraron una expresión diferencial durante el tratamiento. La Figura 14 ilustra la asociación funcional entre este conjunto de proteínas. En la investigación se identificaron dos grupos de proteínas con expresión diferencial (inhibidas y sobreexpresadas), en respuesta al tratamiento con el aceite esencial LOT-II asociadas directamente con las capacidades de supervivencia y funcionamiento del microorganismo. Se constató que tres proteínas dentro de la misma ruta mostraron un incremento en su concentración (señaladas con verde en la Figura 14), mientras que las demás proteínas en la ruta experimentaron una disminución en su concentración, lo que evidencia que la totalidad de la ruta metabólica dejó de ser prioritaria para el microorganismo. Esto sugiere que cambios en la expresión de las proteínas, tanto sobreexpresión como inhibición, podrían tener implicaciones significativas en la función y supervivencia del microorganismo.



**Figura 14.** Interactoma de proteínas expresadas diferencialmente por *P. aeruginosa* en respuesta al aceite esencial LOT-II. Construido en: STRING v12.0

Las proteínas sobreexpresadas, registradas en la Se documentaron tanto el punto isoeléctrico como el peso molecular de cada spot, datos proporcionados por MASCOT. Se aseguró que estos valores coincidieran con los resultados obtenidos de los geles., en la Sección 4.4, se relacionan con la respuesta al estrés oxidativo inducido por el tratamiento con el aceite esencial. Este incremento se puede interpretar como un intento del microorganismo de redireccionar el metabolismo a la búsqueda de un mecanismo de defensa contra el estrés ocasionado por el AE LOT-II. Las proteínas sobreexpresadas, ARNt-citidina(32) 2-sulfurtransferasa, Hidroxilasa tipo PKHD, y Pantotenato sintetasa se asocian directamente con los procesos metabólicos de crecimiento, adaptación y supervivencia de *P. aeruginosa* (BioBook, 2021).

Específicamente, la ARNt-citidina(32) 2-sulfurtransferasa es una molécula crucial en la síntesis de proteínas, modifica una base de la citidina en la posición 32 del ARNt, mediante la adición de un grupo sulfuro. Esta modificación es esencial para el correcto emparejamiento entre el ARNt y los codones en el ARNm durante la traducción (Bimai et al., 2020). La proteína Hidroxilasa tipo PKHD PiuC se involucra en la biosíntesis de compuestos orgánicos, como los aminoácidos o los ácidos grasos, mediante la introducción de grupos hidroxilo en posiciones específicas. Esta proteína está relacionada con la adaptación al entorno y la síntesis de moléculas esenciales para el crecimiento y la supervivencia del microorganismo. También se relaciona con el proceso de apoptosis como respuesta a estímulos externos que deterioren la célula (Y. Song et al., 2022). La enzima Pantotenato Sintetasa participa en la síntesis de la coenzima A (CoA) fundamental para numerosas reacciones metabólicas, incluyendo la degradación de ácidos grasos, la síntesis de aminoácidos y la producción de energía. Esta enzima también puede ser crucial para la regulación de rutas metabólicas y la homeostasis celular (Samala et al., 2014).

El fenómeno de sobreexpresión tiene un impacto significativo en varios procesos bioquímicos celulares, incluyendo la producción de proteínas. Cuando se detecta un daño en el proteoma, se activa un mecanismo de defensa como respuesta, que resulta en la sobreexpresión de las proteínas encargadas de reparar dicho daño. Sin embargo, estos mecanismos también pueden tener un costo energético para el microorganismo y contribuir a su susceptibilidad al tratamiento antimicrobiano.

Por otro lado, las proteínas inhibidas representativas se muestran en la Tabla 5, en la Sección 4.4. Esta inhibición tiene un impacto directo en el correcto funcionamiento del microorganismo *P. aeruginosa*, limitando su habilidad para llevar a cabo funciones vitales. Las proteínas identificadas con inhibición en su expresión, Factor de reciclaje de ribosomas, NADH-quinona oxidoreductasa subunidad C, Proteínas bL12 y uL30 de la subunidad ribosómica grande, Factor de elongación P, y Ribonucleasas HI y HII desempeñan roles fundamentales en los procesos energéticos y de traducción dentro de la célula.

El ARNm se une a los ribosomas, donde se ensamblan los aminoácidos para sintetizar proteínas. El Factor de Reciclaje de Ribosomas es crucial para separar el ribosoma del ARNm y reutilizarlo para futuras síntesis. La inhibición de la presencia de esta proteína, podría implicar que los ribosomas se encuentran atrapados en el ARNm, lo cual ralentizaría la síntesis de proteínas o incluso la detendría por completo esta función (Nakano et al., 2003). La NADH-quinona oxidoreductasa subunidad C es una proteína esencial en el transporte de electrones desde el

NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) hasta la ubiquinona, generando un gradiente de protones que impulsan la síntesis de ATP (Galán González, 2021). Al inhibirse la expresión de esta proteína, también se reduce la transferencia de electrones, afectando la energía disponible para las funciones celulares. A su vez, la subunidad C está relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno, que, al disminuir su expresión, altera la señalización celular y la respuesta al estrés oxidativo (Di Bernardo & Yagi, 2001).

Las proteínas bL12 y uL30 de la subunidad ribosómica grande son constituyentes estructurales del ribosoma y participan en la síntesis de proteínas. Los componentes bioactivos del aceite esencial pueden unirse a las proteínas bL12 y uL30, alterando su conformación o impidiendo su interacción con otras moléculas ribosómicas. Las proteínas sintetizadas podrían estar defectuosas o incompletas debido a la disminución de la función ribosómica. Esto podría afectar la función de enzimas, receptores entre otras proteínas (Tani et al., 2023; Younkin et al., 2020).

El Factor de Elongación P facilita la traducción de los códigos genéticos en proteínas funcionales. La unión de esta proteína al ribosoma en el sitio P es necesaria para estabilizar el ARNt, forzando así una conformación de la cadena naciente que proporciona una geometría de sustrato favorable para la formación del enlace peptídico. La inhibición de su expresión puede afectar funciones celulares esenciales, como el crecimiento y la reparación (Pinheiro et al., 2020).

Algunos componentes de los aceites esenciales como los terpenos o los fenoles pueden interactuar directamente los sitios activos con las Ribonucleasas HI y HII, inhibiendo su función. También puede ocurrir que se module la expresión de los genes que codifican las proteínas RNasa HI y HII, influyendo en su cantidad o actividad celular en el microorganismo (Pileur et al., 2000).

En la Tabla 6 se representa una serie de procesos biológicos, identificados por términos de la Ontología Génica (GO), y las proteínas asociadas a cada proceso en la red de interacción de proteínas de *Pseudomonas aeruginosa*. La Ontología Génica es un sistema de clasificación que se utiliza para describir las funciones de los genes y las proteínas en cualquier organismo. En esta tabla se listaron las proteínas que están asociadas con cada término de la Ontología Génica en la red de interacción de proteínas. Los datos fueron generados utilizando la base de datos STRING, que proporciona información sobre interacciones de proteínas conocidas y predichas.

**Tabla 6.** Enriquecimientos funcionales en la red de interacciones de proteínas identificadas

<b>Término de Ontología Génica</b>	<b>Proceso Biológico (Ontología Génica)</b>	<b>Recuento en la red (Proteínas )</b>
IR:0006412	Traducción	efp, frf, rpIL, rpmD
IR:0006807	Proceso metabólico de compuestos nitrogenados	PA1769, ttcA, panC, efp, frf, rpIL, rpmD, rnhA, rnhB
IR:0043170	Proceso metabólico de macromoléculas	PA1769, ttcA, efp, frf, rpIL, rpmD, rnhA, rnhB
IR:0010467	Expresión génica	ttcA, efp, frf, rpIL, rpmD
IR:0043137	Replicación del ADN, eliminación del cebador de ARN	rnhA, rnhB
IR:0034641	Proceso metabólico de compuestos nitrogenados celulares	ttcA, panC, efp, frf, rpIL, rpmD, rnhA, rnhB
IR:0044237	Proceso metabólico celular	PA1769, ttcA, panC, efp, frf, rpIL, rpmD, nuoD, rnhA, rnhB
IR:0044260	Proceso metabólico de la macromolécula celular	efp, frf, rpIL, rpmD, rnhA, rnhB
IR:0043604	Proceso biosintético de amida	panC, efp, frf, rpIL, rpmD

## 5. CONCLUSIONES

El aceite esencial de *Lippia origanoides* LOT-II en una concentración subinhibitoria (inhibición menor del 30 % de la población microbiana), demostró tener un impacto relevante en la expresión proteica de *P. aeruginosa*. Al comparar los patrones de expresión de las proteínas de *P. aeruginosa*, en presencia y ausencia de aceite esencial, se observó que después del tratamiento, una parte del proteoma del microorganismo experimentó cambios significativos en su expresión, específicamente en ciertas proteínas que fueron analizadas posteriormente mediante espectrometría de masas MALDI-TOF e identificadas con la base de datos MASCOT.

El tratamiento de *P. aeruginosa* en estado planctónico a una concentración de 0,375 mg/mL del AE de LOT-II, presentó un reducido porcentaje de proteínas que aumentaron su expresión de manera diferencial. Entre las proteínas sobreexpresadas se encontraron la ARNt-citidina(32) 2-sulfurtransferasa, la Hidroxilasa tipo PKHD PiuC, la Pantotenato Sintetasa y la Proteína de biosíntesis del alginato. Sin embargo, la mayor parte del proteoma mostró una reducción en su expresión de manera diferencial. Las proteínas identificadas con inhibición incluyen el Factor de Reciclaje de Ribosomas, la NADH-quinona oxidoreductasa subunidad C, la subunidad pequeña de la metiltransferasa G del ARN ribosómico, las Proteínas bL12 y uL30 de la subunidad ribosómica grande, el Factor de elongación P y las Ribonucleasas HII Y HI.

El efecto antimicrobiano de este aceite esencial puede estar relacionado con la inhibición de las proteínas involucradas en los procesos energéticos y de traducción. Esto incluye la síntesis de ATP, la producción de proteínas, la unión del ARN mensajero y la determinación de la cantidad y secuencia de aminoácidos en las cadenas peptídicas de las proteínas, las cuales son fundamentales para la función, estabilidad, estructura y supervivencia al microorganismo, a su vez, las proteínas que presentaron sobreexpresión se asocian con los procesos de mitigación del daño causado por el estrés oxidativo al que se encontró sometida la bacteria. Sin embargo, este estrés puede resultar en un aumento del gasto energético del microorganismo en defensa propia, lo que a su vez puede incrementar su susceptibilidad al tratamiento.

Los hallazgos presentados en este estudio destacan la complejidad de las respuestas microbianas al estrés y la importancia de considerar tanto los mecanismos de defensa como las vulnerabilidades al evaluar el impacto de un tratamiento. Por lo tanto, aunque la inhibición de ciertas proteínas y la sobreexpresión de otras pueden parecer respuestas opuestas al tratamiento, ambas pueden contribuir a la eficiencia del tratamiento con el aceite esencial en la inhibición del crecimiento y la supervivencia de *P. aeruginosa* en estado planctónico.

## RECOMENDACIONES

Para lograr una comprensión más profunda y completa de la respuesta del proteoma de *Pseudomonas aeruginosa* al tratamiento con el aceite esencial de *Lippia origanoides*, es recomendable llevar a cabo un análisis de las proteínas presentes en los geles de electroforesis que no fueron estudiadas en esta investigación. Al hacerlo, se puede obtener información valiosa sobre los mecanismos moleculares subyacentes que la bacteria utiliza para adaptarse y responder al tratamiento con el aceite esencial.

Para optimizar la eficiencia del tratamiento, se sugiere ajustar las concentraciones del aceite esencial de *Lippia origanoides* con el objetivo de identificar la concentración específica que inhibe la expresión de *Pseudomonas aeruginosa* en un 50 %, y de esta manera identificar una gama más amplia de proteínas diferenciales.

Se recomienda realizar una evaluación de la actividad enzimática de las proteínas identificadas, con el fin de confirmar su sobreexpresión o inhibición. Al realizar esta evaluación, se puede obtener una comprensión más profunda de cómo estas variaciones en la expresión de proteínas pueden afectar las funciones biológicas y los procesos celulares.

Este proyecto proporcionó una base para futuras investigaciones y el desarrollo de tratamientos contra infecciones por *P. aeruginosa*. Se recomienda la exploración de compuestos naturales contra bacterias resistentes a los antibióticos, y la creación de nuevos protocolos de tratamiento.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abraham, A., Tahir, M., Sasikumar, J. M., Kebede, M., Ejigu, M. C., & Yones, A. M. (2024). Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. And *Eucalyptus tetragona* F.Muell. *Pharmacological Research - Natural Products*, 3, 100033. <https://doi.org/10.1016/j.prenap.2024.100033>
- Adenipekun, E. O., Akinleye, E. F., Tewogbade, O. A., & Iwalokun, B. A. (2023). Detection of virulence genes and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a public hospital in Lagos, Nigeria. *Scientific African*, 22, e01950. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01950>
- Adolpho, L. O., Paz, L. H. A., Rosa, O., Morel, A. F., & Dalcol, I. I. (2024). Chemical profile and antimicrobial activity of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. Essential oils. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2245957>
- Anjaly Shanker, M., Khanashyam, A. C., Thorakkattu, P., & Nirmal, N. P. (2023). Chapter 21— Biological potential of essential oils in pharmaceutical industries. En S. Pati, T. Sarkar, & D. Lahiri (Eds.), *Recent Frontiers of Phytochemicals* (pp. 369-382). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19143-5.00036-0>
- Arizmendi, A., Gribaudo, V., Lonigro, M., Loyola, A., Polarolo, A., & Wingeyer, E. (2013). *ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (ISOELECTROENFOQUE y SDS-PAGE)*. <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/Electroforesis%20D%20%28IEF+SDS-PAGE%29.pdf>
- Ashraf, S., Bashir, N., Rashid, N., Chughtai, A. H., Zia, K. M., Majeed, S., Ashiq, M. N., Murtaza, G., & Najam-ul-Haq, M. (2021). Introduction to Drugs, Drug Targets and Drug Resistance.

- En S. Ahmed, S. Chandra Ojha, M. Najam-ul-Haq, M. Younus, & M. Z. Hashmi (Eds.), *Biochemistry of Drug Resistance* (pp. 1-31). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-76320-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-76320-6_1)
- Balasubramanian, V., Sellegounder, D., Suman, K., & Krishnaswamy, B. (2016). Proteome analysis reveals translational inhibition of *Caenorhabditis elegans* enhances susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pathogenesis. *Focus on Medical Proteomics and Protein Quantitation*, 145, 141-152. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.025>
- Barallobre-Barreiro, J., Chung, Y.-L., & Mayr, M. (2013). La proteómica y la metabolómica: Los mecanismos de la enfermedad cardiovascular y el descubrimiento de biomarcadores. *Revista Española de Cardiología*, 66(8), 657-661.  
<https://doi.org/10.1016/j.recesp.2013.04.010>
- Bashir, A., & Brown, J. S. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*. En S. M. Janes (Ed.), *Encyclopedia of Respiratory Medicine (Second Edition)* (pp. 14-22). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102723-3.00258-4>
- Bennik, M. H. J. (1999). PSEUDOMONAS | *Pseudomonas aeruginosa*. En R. K. Robinson (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 1867-1871). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.1295>
- Bhattacharjee, M. K. (2022). Introduction to Antibiotics. En M. K. Bhattacharjee (Ed.), *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs* (pp. 1-28). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-031-07582-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-031-07582-7_1)
- Bimai, O., Arragain, S., & Golinelli-Pimpaneau, B. (2020). Structure-based mechanistic insights into catalysis by tRNA thiolation enzymes. *Catalysis and Regulation • Protein Nucleic Acid Interaction*, 65, 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.002>

- Bio, S. (2023, septiembre 22). *Espectrometría de masas (MS): Principio, partes, funcionamiento, pasos, usos*. Microbiology Note. <https://microbiologynote.com/es/espectrometr%C3%ADa-de-masas/>
- BioBook. (2021). *Procesos básicos del funcionamiento celular: Clave para la vida*. [https://biobook.es/procesos-basicos-del-funcionamiento-celular/?damemas\\_lectura=1](https://biobook.es/procesos-basicos-del-funcionamiento-celular/?damemas_lectura=1)
- Blanco Hernández, A., García Contreras, R., Sánchez Fernández, R., Palma Tenango, M., Cibrián Tovar, J., Muñoz Cazares, N., Soto Hernández, M., Padilla Chacon, D., Prado Galbarro, J., & Castillo Juárez, I. (2019). *ASSESSMENT OF ANTIVIRULENCE ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST Pseudomonas aeruginosa*. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802019000300215](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802019000300215)
- Blattmann, P., & Aebersold, R. (2023). OMICS – Mass Spectrometry-Based Proteomics in Systems Biology Research. En R. A. Bradshaw, G. W. Hart, & P. D. Stahl (Eds.), *Encyclopedia of Cell Biology (Second Edition)* (pp. 372-384). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821618-7.00158-9>
- Bowler-Barnett, E. H., Fan, J., Luo, J., Magrane, M., Martin, M. J., & Orchard, S. (2023). UniProt and Mass Spectrometry-Based Proteomics—A 2-Way Working Relationship. *Molecular & Cellular Proteomics*, 22(8), 100591. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2023.100591>
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>
- Camarasa, C. G., & Cobo, F. (2018). Chapter Twelve—Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Virology. En F. Cobo (Ed.), *The Use of Mass Spectrometry*

- Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology* (pp. 167-180). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.00012-5>
- Cañizares, J. (2010). *Análisis de expresión diferencial*. BioMur modulo3 v1.1 documentation.  
[https://personales.upv.es/jcanizar/modulo\\_3/diferenciales\\_4.html](https://personales.upv.es/jcanizar/modulo_3/diferenciales_4.html)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019, noviembre 13). *Pseudomonas aeruginosa in Healthcare Settings*. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth informational supplement*.
- Colino Palomino, C. (2021). *Herramientas proteómicas para el análisis y diagnóstico molecular* [Trabajo Fin de Grado, Universidad de Jaén].  
<https://crea.ujaen.es/bitstream/10953.1/14412/1/TFGB%20Colino%20Palomino%2c%20Cristina.pdf>
- Di Bernardo, S., & Yagi, T. (2001). Direct interaction between a membrane domain subunit and a connector subunit in the H<sup>+</sup>-translocating NADH-quinone oxidoreductase. *FEBS Letters*, 508(3), 385-388. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03111-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03111-8)
- Díaz Gadea, P. (2011). *Asimilación de amonio y acumulación de osmolitos nitrogenados en condiciones de déficit hídrico en la leguminosa modelo Lotus japonicus* [Universidad de la República].  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/4133/1/uy24-15240.pdf>
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. En *Microbiology* (Vol. 166, Número 1, pp. 30-33). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>

- Dilmetz, B. A., Hoffmann, P., & Condina, M. R. (2021). Quantitative Approach Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-ToF) Mass Spectrometry. En K. Marcus, M. Eisenacher, & B. Sitek (Eds.), *Quantitative Methods in Proteomics* (pp. 159-166). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4_12)
- dos Santos, F. J. B., Lopes, J. A. D., Cito, A. M. G. L., de Oliveira, E. H., de Lima, S. G., & Reis, F. de A. M. (2004). Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), 504-506. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698782>
- Galán González, A. (2021, febrero 22). *Qué es el NAD y por qué debe importarte*. <https://www.neolifasalud.com/blog/prevencion-y-antiaging/que-es-el-nad-y-por-que-debe-importarte/>
- Giebel, R., Worden, C., Rust, S. M., Kleinheinz, G. T., Robbins, M., & Sandrin, T. R. (2010). Chapter 6—Microbial Fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): Applications and Challenges. En *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 71, pp. 149-184). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)71006-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)71006-6)
- Gomes dos Santos, B. N., Furtado, M. M., Freitas, E. E. de, Lima, L. R., Leão, P. V. S., Alcântara Oliveira, F. A. de, Freire de Medeiros, M. das G., Andrade, E. M. de, Feitosa, R. C. A., Silva Tavares, S. J. da, Coutinho, H. D. M., Ferreira, J. H. L., & Barreto, H. M. (2023). Chemical profile of the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth and antibiotic resistance-modifying activity by gaseous contact method. *Journal of Herbal Medicine*, 41, 100703. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100703>

- Graves Paul R. & Haystead Timothy A. J. (2002). Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 39-63. <https://doi.org/10.1128/membr.66.1.39-63.2002>
- Hamers, L. (2016). *Big biological datasets map life's networks Multi-omics offers a new way of doing biology*. <https://www.sciencenews.org/article/big-biological-datasets-map-lifes-networks>
- Ickovski, J. D., Cvetković, V. J., Jovanović, N. M., Mitrović, T. Lj., & Stojanović, G. S. (2024). Serbian Artemisia species – chemical composition, acute toxicity and larvicidal activity of the essential oils. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2334312>
- Iwański, B., & Andrejko, M. (2023). Changes in the apolipoprotein III in *Galleria mellonella* larvae treated with *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Journal of Insect Physiology*, 149, 104536. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2023.104536>
- Jungblut, P. R. (2006). Two-Dimensional Gel Electrophoresis. En *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine* (pp. 1942-1944). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9\\_1030](https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_1030)
- Khan, S., Sahar, A., Tariq, T., Sameen, A., & Tariq, F. (2023). Chapter 1—Essential oils in plants: Plant physiology, the chemical composition of the oil, and natural variation of the oils (chemotaxonomy and environmental effects, etc.). En G. A. Nayik & M. J. Ansari (Eds.), *Essential Oils* (pp. 1-36). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91740-7.00016-5>
- Kim, D., Mun, S., Lee, J., Park, A., Seok, A., Chun, Y.-T., & Kang, H.-G. (2018). Proteomics analysis reveals differential pattern of widespread protein expression and novel role of

- histidine-rich glycoprotein and lipopolysaccharide-binding protein in rheumatoid arthritis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 704-710. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.075>
- Knudsen, A. D., Bennike, T., Kjeldal, H., Birkelund, S., Otzen, D. E., & Stensballe, A. (2014). Condenser: A statistical aggregation tool for multi-sample quantitative proteomic data from Matrix Science Mascot Distiller™. *Journal of Proteomics*, 103, 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.001>
- Madda, R., Lin, S.-C., Sun, W.-H., & Huang, S.-L. (2019). Differential expressions of plasma proteins in systemic lupus erythematosus patients identified by proteomic analysis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52(5), 816-826. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.02.004>
- Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2018). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*, 22, 35-45.
- Malmström, L., Quandt, A., & Pustulka-Hunt, E. (2013). Proteomics. En W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K.-H. Cho, & H. Yokota (Eds.), *Encyclopedia of Systems Biology* (pp. 1792-1795). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7\\_1003](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_1003)
- Martínez, A., Stashenko, E. E., Sáez, R. T., Zafra, G., & Ortiz, C. (2023). Effect of Essential Oil from *Lippia origanoides* on the Transcriptional Expression of Genes Related to Quorum Sensing, Biofilm Formation, and Virulence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050845>
- Martinez Guarnizo, J. C. (2019). *MODELAMIENTO DE LA RED METABOLICA DE Pseudomonas aeruginosa PAO1 PARA LA SÍNTESIS BIOLÓGICA DE FENAZINA-1-CARBOXILATO* [Pontificia Universidad Javeriana].

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/43140/Tesis%20de%20Micro%20documento%20definitivo.pdf>

Matrix Science. (2023). *Mascot search engine | An introduction to Mascot Server*. MATRIX SCIENCE. <https://www.matrixscience.com/server.html>

Matrix Science. (2024, febrero 26). *Mascot search engine | Protein identification software for mass spec data*. MATRIX SCIENCE. <https://www.matrixscience.com/>

Maurya, A., Prasad, J., Das, S., & Dwivedy, A. K. (2021). Essential Oils and Their Application in Food Safety. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.653420>

Mehdizadeh, L., & Moghaddam, M. (2018). Chapter 10—Essential Oils: Biological Activity and Therapeutic Potential. En A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods* (pp. 167-179). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814625-5.00010-8>

Meleady, P. (2023). Two-Dimensional Gel Electrophoresis and 2D-DIGE. En K. Ohlendieck (Ed.), *Difference Gel Electrophoresis: Methods and Protocols* (pp. 3-15). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2831-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2831-7_1)

Molina-Mora, J. A., Chinchilla-Montero, D., Castro-Peña, C., & García, F. (2022). Análisis de imágenes bidimensionales de electroforesis en gel de dos clones de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Tecnología en Marcha*, 35(8), Pág. 67-73. <https://doi.org/10.18845/tm.v35i8.6452>

Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>

- Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2014). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00422>
- Muñoz, A., Castañeda, M. L., Blanco, K., Cardenas, C., Reyes, J., Kouznetsov, V., & Stashenko, E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de TIMOL Y CARVACROL. *Scientia Et Technica*, *XIII*, 125-128.
- Nakano, H., Yoshida, T., Uchiyama, S., Kawachi, M., Matsuo, H., Kato, T., Ohshima, A., Yamaichi, Y., Honda, T., Kato, H., Yamagata, Y., Ohkubo, T., & Kobayashi, Y. (2003). Structure and Binding Mode of a Ribosome Recycling Factor (RRF) from Mesophilic Bacterium\*210. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(5), 3427-3436. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208098200>
- Neves, P. R., McCulloch, J. A., Mamizuka, E. M., & Lincopan, N. (2014). PSEUDOMONAS | *Pseudomonas aeruginosa*. En C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 253-260). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00283-4>
- Ni, Z.-J., Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J.-G., Hu, F., & Wei, Z.-J. (2021). Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.070>
- O'Farrell, P. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, *250*(10), 4007-4021. PubMed. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)41496-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)41496-8)
- Oliveira, D. R., Leitão, G. G., Bizzo, H. R., Lopes, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Leitão, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry*, *101*(1), 236-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.022>

Organización Mundial de la Salud. (2020, julio 31). *Resistencia a los antibióticos*.

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

Oz, Y., Nabawy, A., Fedeli, S., Gupta, A., Huang, R., Sanyal, A., & Rotello, V. M. (2021).

Biodegradable Poly(lactic acid) Stabilized Nanoemulsions for the Treatment of Multidrug-Resistant Bacterial Biofilms. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(34), 40325-40331.

<https://doi.org/10.1021/acsami.1c11265>

Pando-Robles, R. V., & Lanz-Mendoza, H. (2009). *La importancia de la proteómica en la salud pública*.

[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342009000900004](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900004)

Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D.,

Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa: Patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria*. *Revista chilena de infectología*, 36, 180-189.

Pérez Santiago, G., González Castillo, M. P., Iturbide, G. A., & González Güereca, M. C. (2011).

*EL ORÉGANO MEXICANO: ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO* (Primera edición). Artes Gráficas La Impresora “LA CASA EDITORIAL DE DURANGO”.

[https://www.researchgate.net/profile/Jose-Hernandez-](https://www.researchgate.net/profile/Jose-Hernandez-Herrera/publication/295906284_LA_CERTIFICACION_ORGANICA_ALTERNATIVA_PARA_LA_COMERCIALIZACION_DEL_OREGANO_Lippia_spp/links/56cfc5b108aeb52500c9af19/LA-CERTIFICACION-ORGANICA-ALTERNATIVA-PARA-LA-COMERCIALIZACION-DEL-OREGANO-Lippia-spp.pdf)

[Herrera/publication/295906284\\_LA\\_CERTIFICACION\\_ORGANICA\\_ALTERNATIVA\\_PARA\\_LA\\_COMERCIALIZACION\\_DEL\\_OREGANO\\_Lippia\\_spp/links/56cfc5b108a](https://www.researchgate.net/profile/Jose-Hernandez-Herrera/publication/295906284_LA_CERTIFICACION_ORGANICA_ALTERNATIVA_PARA_LA_COMERCIALIZACION_DEL_OREGANO_Lippia_spp/links/56cfc5b108aeb52500c9af19/LA-CERTIFICACION-ORGANICA-ALTERNATIVA-PARA-LA-COMERCIALIZACION-DEL-OREGANO-Lippia-spp.pdf)

[eb52500c9af19/LA-CERTIFICACION-ORGANICA-ALTERNATIVA-PARA-LA-COMERCIALIZACION-DEL-OREGANO-Lippia-spp.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jose-Hernandez-Herrera/publication/295906284_LA_CERTIFICACION_ORGANICA_ALTERNATIVA_PARA_LA_COMERCIALIZACION_DEL_OREGANO_Lippia_spp/links/56cfc5b108aeb52500c9af19/LA-CERTIFICACION-ORGANICA-ALTERNATIVA-PARA-LA-COMERCIALIZACION-DEL-OREGANO-Lippia-spp.pdf)

Pileur, F., Toulme, J.-J., & Cazenave, C. (2000). Eukaryotic ribonucleases HI and HII generate characteristic hydrolytic patterns on DNA–RNA hybrids: Further evidence that

- mitochondrial RNase H is an RNase HIII. *Nucleic Acids Research*, 28(18), 3674-3683.  
<https://doi.org/10.1093/nar/28.18.3674>
- Pinheiro, B., Scheidler, C. M., Kielkowski, P., Schmid, M., Forné, I., Ye, S., Reiling, N., Takano, E., Imhof, A., Sieber, S. A., Schneider, S., & Jung, K. (2020). Structure and Function of an Elongation Factor P Subfamily in Actinobacteria. *Cell Reports*, 30(13), 4332-4342.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.009>
- Quiguanás-Guarín, E. S., Agudelo, J. P. B., López-Carvajal, J. E., Tabares, Y. A. R., Sanabria, L. P., & Castaño-Osorio, J. C. (2021). In vitro antimicrobial and cytotoxic activity of *Lippia origanoides* essential oil against bacteria of potential health concern. *bioRxiv*, 2021.09.02.458771. <https://doi.org/10.1101/2021.09.02.458771>
- Razdan, K., Gondil, V. S., Chhibber, S., Singh, K. K., & Sinha, V. R. (2022). Levofloxacin loaded clove essential oil nanoscale emulsion as an efficient system against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 68, 103039.  
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.103039>
- Regan, M., Engler, M. B., Coleman, B., Daack-Hirsch, S., & Calzone, K. A. (2019). Establishing the Genomic Knowledge Matrix for Nursing Science. *Journal of nursing scholarship*, 51(1), 50-57. <https://doi.org/10.1111/jnu.12427>
- Ribeiro, F. P., Santana de Oliveira, M., de Oliveira Feitosa, A., Santana Barbosa Marinho, P., Moacir do Rosario Marinho, A., de Aguiar Andrade, E. H., & Favacho Ribeiro, A. (2021). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the *Lippia origanoides* Kunth Essential Oil from the Carajás National Forest, Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 9930336. <https://doi.org/10.1155/2021/9930336>

- Rojas, O., Villafana, J., González-Reynoso, O., & A, J. (2006). Análisis de rutas metabólicas en *Pseudomonas aeruginosa* para la producción de polihidroxicanoatos a partir de glucosa usando modos elementales. *e-Gnosis Num.004*.
- Rozanova, S., Barkovits, K., Nikolov, M., Schmidt, C., Urlaub, H., & Marcus, K. (2021). Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview. En K. Marcus, M. Eisenacher, & B. Sitek (Eds.), *Quantitative Methods in Proteomics* (pp. 85-116). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4_8)
- Ruiz-Duran, J., Torres, R., Stashenko, E. E., & Ortiz, C. (2023). Antifungal and Antibiofilm Activity of Colombian Essential Oils against Different Candida Strains. *Antibiotics*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040668>
- Saini, S., Thass, N., Kayesth, J., & Sikhondze, W. (2023). Antimicrobial Resistance Associated with Infectious Diseases. En M. P. Mothadaka, M. Vaiyapuri, M. Rao Badireddy, C. Nagarajrao Ravishankar, R. Bhatia, & J. Jena (Eds.), *Handbook on Antimicrobial Resistance: Current Status, Trends in Detection and Mitigation Measures* (pp. 343-371). Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-9279-7\\_49](https://doi.org/10.1007/978-981-19-9279-7_49)
- Samala, G., Devi, P. B., Nallangi, R., Sridevi, J. P., Saxena, S., Yogeeswari, P., & Sriram, D. (2014). Development of novel tetrahydrothieno[2,3-c]pyridine-3-carboxamide based Mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase inhibitors: Molecular hybridization from known antimycobacterial leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(6), 1938-1947. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.01.030>
- Sanya, D. R. A., Onésime, D., Vizzarro, G., & Jacquier, N. (2023). Recent advances in therapeutic targets identification and development of treatment strategies towards *Pseudomonas*

- aeruginosa infections. *BMC Microbiology*, 23(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02832-x>
- Schumann, P., & Maier, T. (2014). Chapter 13—MALDI-TOF Mass Spectrometry Applied to Classification and Identification of Bacteria. En M. Goodfellow, I. Sutcliffe, & J. Chun (Eds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 41, pp. 275-306). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.06.002>
- Sin, C., Britos, M., Chamorro, E., Cáceres, M., Fernández, D., & Ortega, S. (2021, agosto). *Aceites esenciales con actividad antibacteriana: Posible aplicación y administración en odontología*. <https://revistas.ulatina.ac.cr/index.php/odontologiavital>
- Song, M., Liu, Y., Huang, X., Ding, S., Wang, Y., Shen, J., & Zhu, K. (2020). A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Nature Microbiology*, 5(8), 1040-1050. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0723-z>
- Song, Y., Zhang, S., Ye, Z., Song, Y., Chen, L., Tong, A., He, Y., & Bao, R. (2022). The novel type II toxin–antitoxin PacTA modulates *Pseudomonas aeruginosa* iron homeostasis by obstructing the DNA-binding activity of Fur. *Nucleic Acids Research*, 50(18), 10586-10600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac867>
- Sosa Escudero, M. (2019, octubre 9). *METABOLISMO DE AMINOACIDOS*. <https://fcen.uncuyo.edu.ar/upload/metabaac19.pdf>
- Stower, H. (2020). Antibiotic tolerance leads to antibiotic resistance. *Nature Medicine*, 26(2), 163-163. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0778-7>
- Tang, C., Chen, J., Zhang, L., Zhang, R., Zhang, S., Ye, S., Zhao, Z., & Yang, D. (2020). Exploring the antibacterial mechanism of essential oils by membrane permeability, apoptosis and biofilm formation combination with proteomics analysis against methicillin-resistant

- staphylococcus aureus. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(5), 151435.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151435>
- Tani, I., Oikawa, Y., Doi, S., Janairo, J. I. B., Kamada, R., & Sakaguchi, K. (2023). Ribosomal protein uL30 undergoes phase separation with nucleophosmin and regulates nucleolar formation in the absence of RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 642, 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.12.041>
- Tantray, J. A., Mansoor, S., Wani, R. F. C., & Nissa, N. U. (2023). Chapter 20—To estimate protein by Bradford assay. En J. A. Tantray, S. Mansoor, R. F. C. Wani, & N. U. Nissa (Eds.), *Basic Life Science Methods* (pp. 83-86). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19174-9.00020-9>
- Vennou, K. E., Kontou, P. I., Braliou, G. G., & Bagos, P. G. (2020). Meta-analysis of gene expression profiles in preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*, 19, 52-60.  
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2019.12.007>
- Vohra, M., Kour, A., Kalia, N. P., Kumar, M., Sharma, S., Jaglan, S., Kamath, N., & Sharma, S. (2024). A comprehensive review of genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomic insights into the differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from the planktonic to biofilm state: A multi-omics approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 257, 128563. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128563>
- World Health Organization. (2017, febrero 27). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- World Health Organization. (2023, noviembre 21). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

- Wu, H., Ma, L., Li, S., Wang, J., Li, T., Peng, L., Li, S., Li, Q., Yuan, X., Zhou, M., Zhang, Z., & Liu, Y. (2023). Sustained-release antibacterial gelatin films: Effects of diatomite/carvacrol complex on their structure, physicochemical and antibacterial properties. *Food Packaging and Shelf Life*, 35, 101019. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.101019>
- Yang, Z., He, S., Wei, Y., Li, X., Shan, A., & Wang, J. (2023). Antimicrobial peptides in combination with citronellal efficiently kills multidrug resistance bacteria. *Phytomedicine*, 120, 155070. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155070>
- Younkin, A. D., Gregory, S. T., & O'Connor, M. (2020). Alterations in the ribosomal protein bL12 of *E. coli* affecting the initiation, elongation and termination of protein synthesis. *Biochimie*, 175, 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.06.006>
- Zárate, M. S., Romano, V., Nievas, J., & Smayevsky, J. (2014). Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 98-102. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70055-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70055-0)
- Zhang, J., Yan, M., Ji, A., Sun, Q., & Ying, W. (2024). Mass spectrometry-based proteomic analysis of biological stains identifies body fluids specific markers. *Forensic Science International*, 357, 112008. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112008>
- Zhu, L., Su, Y., Ma, Z., Guo, L., Yang, S., & Yu, H. (2022). Comparative proteomic analysis reveals differential protein expression of *Hypsizygus marmoreus* in response to different light qualities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 223, 1320-1334. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.037>

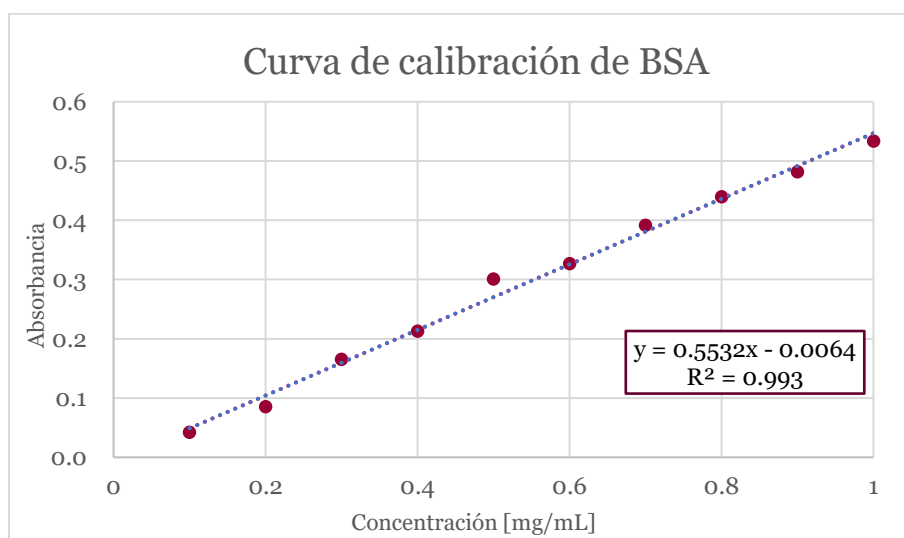
## APÉNDICES

### APÉNDICE A. Información detallada de la cuantificación de proteínas

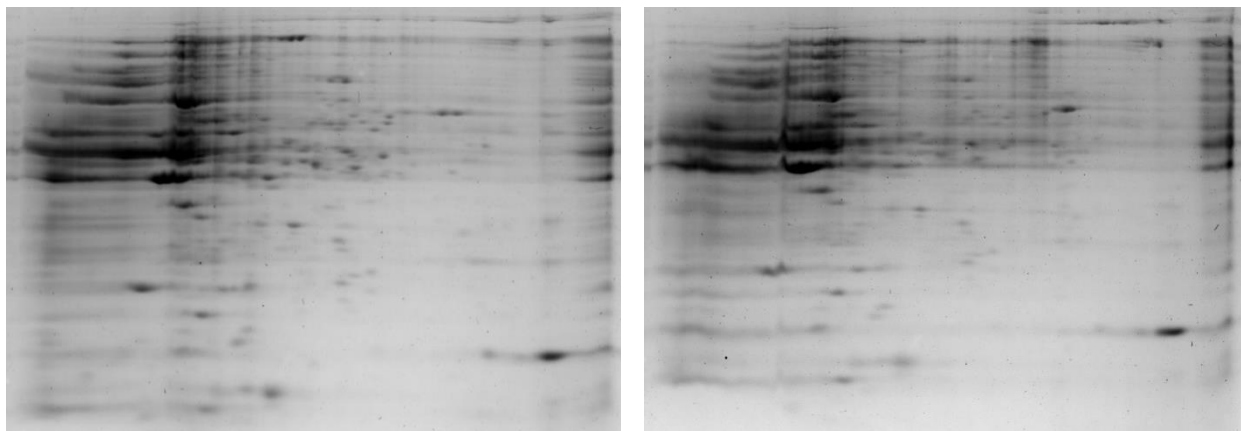
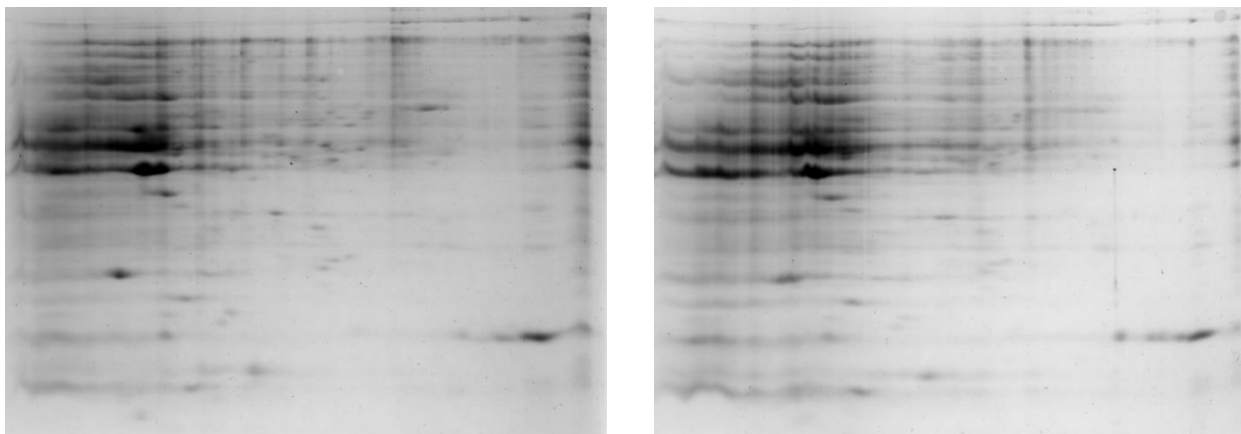
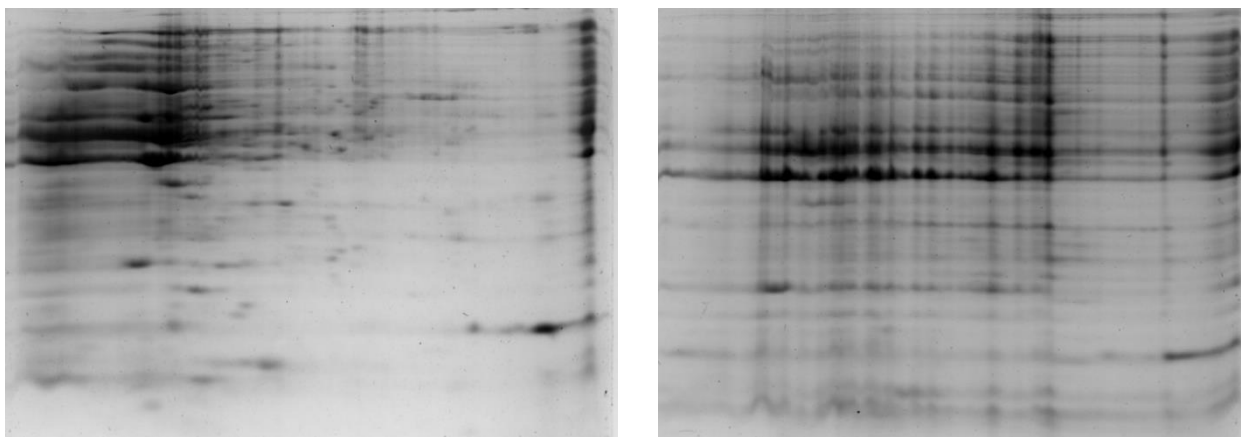
**Tabla A1.** Datos de absorbancia y concentración de los patrones de BSA

Dilución [mg/mL]	M1 - b	M2 - b	M3 - b	Promedio (M - b)
0,1	0,0509	0,0172	0,0582	0,0421
0,2	0,0192	0,1219	0,1148	0,0853
0,3	0,1700	0,1657	0,1602	0,1653
0,4	0,1991	0,2074	0,2314	0,2127
0,5	0,2896	0,2904	0,3218	0,3006
0,6	0,3280	0,3176	0,3346	0,3268
0,7	0,4100	0,3680	0,3964	0,3915
0,8	0,4495	0,4124	0,4573	0,4398
0,9	0,4257	0,5331	0,4852	0,4814
1,0	0,5414	0,5309	0,5274	0,5333

<b>Blanco</b>	0,4265	0,4300	0,4364
<b>Prom Blanco</b>	0,4310		



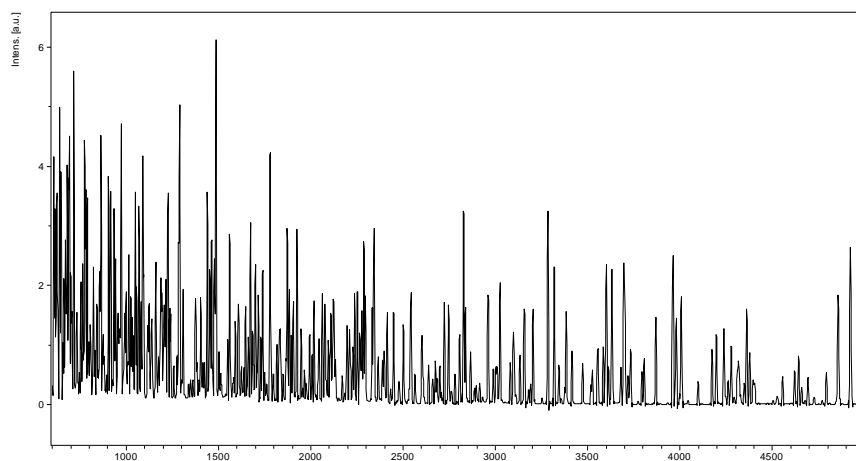
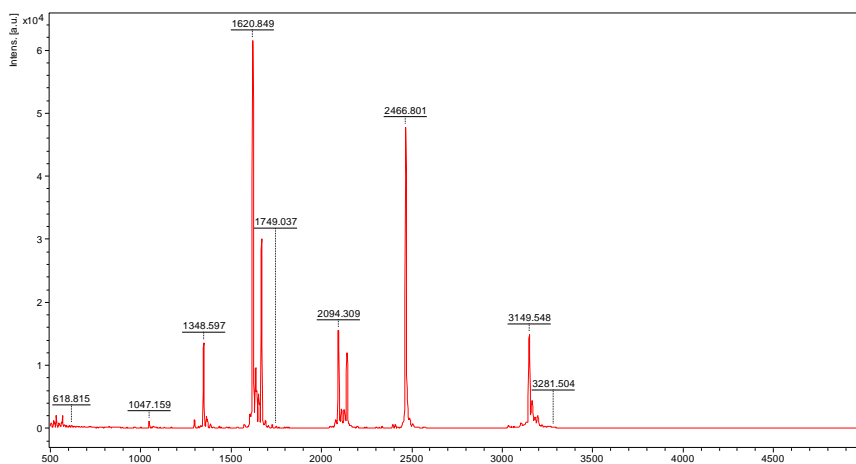
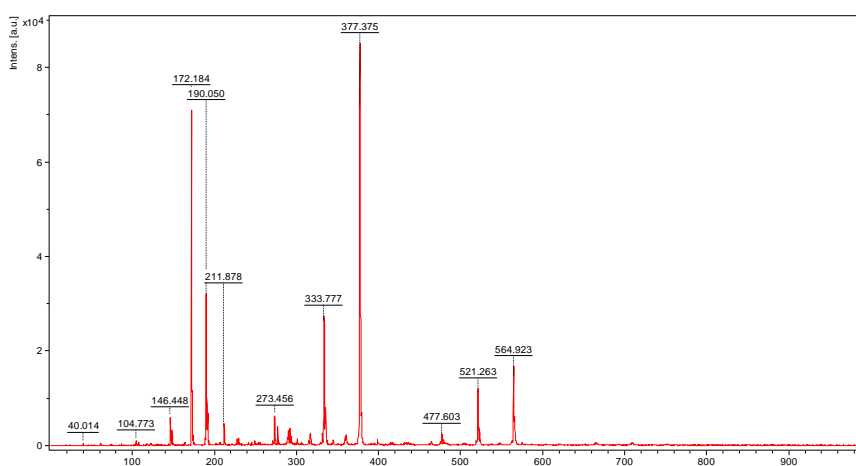
**Figura A1.** Curva de calibración de BSA y ecuación de la recta

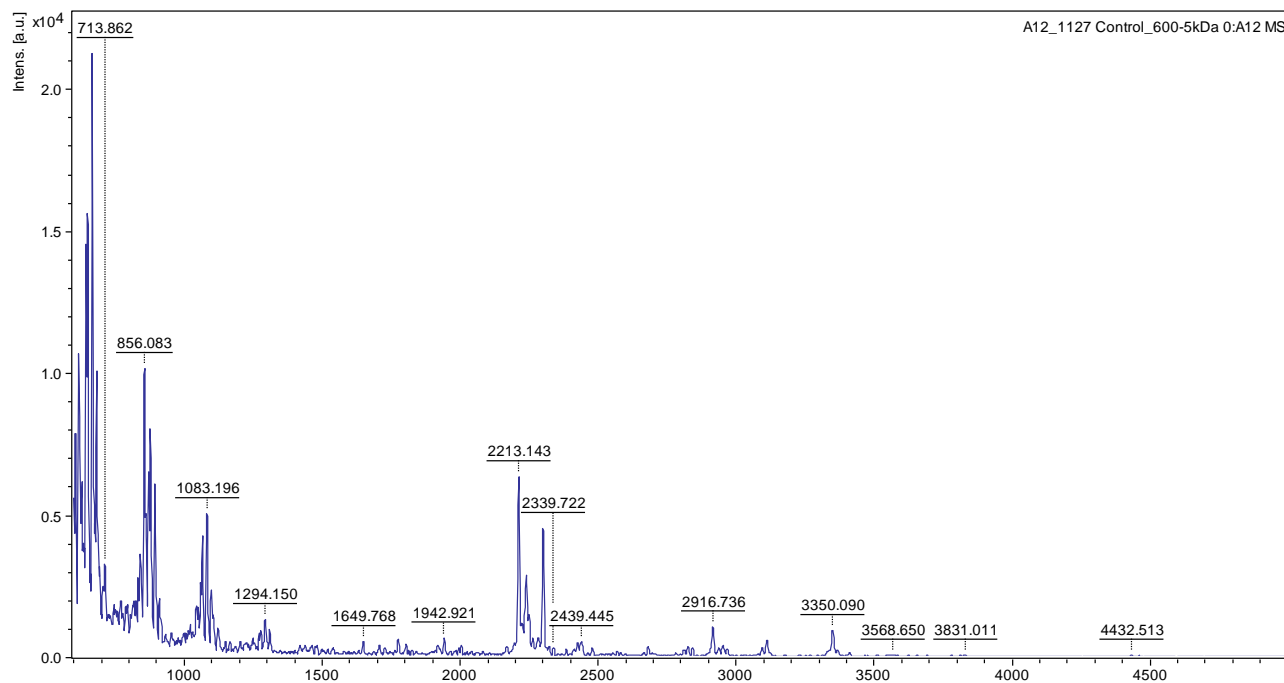
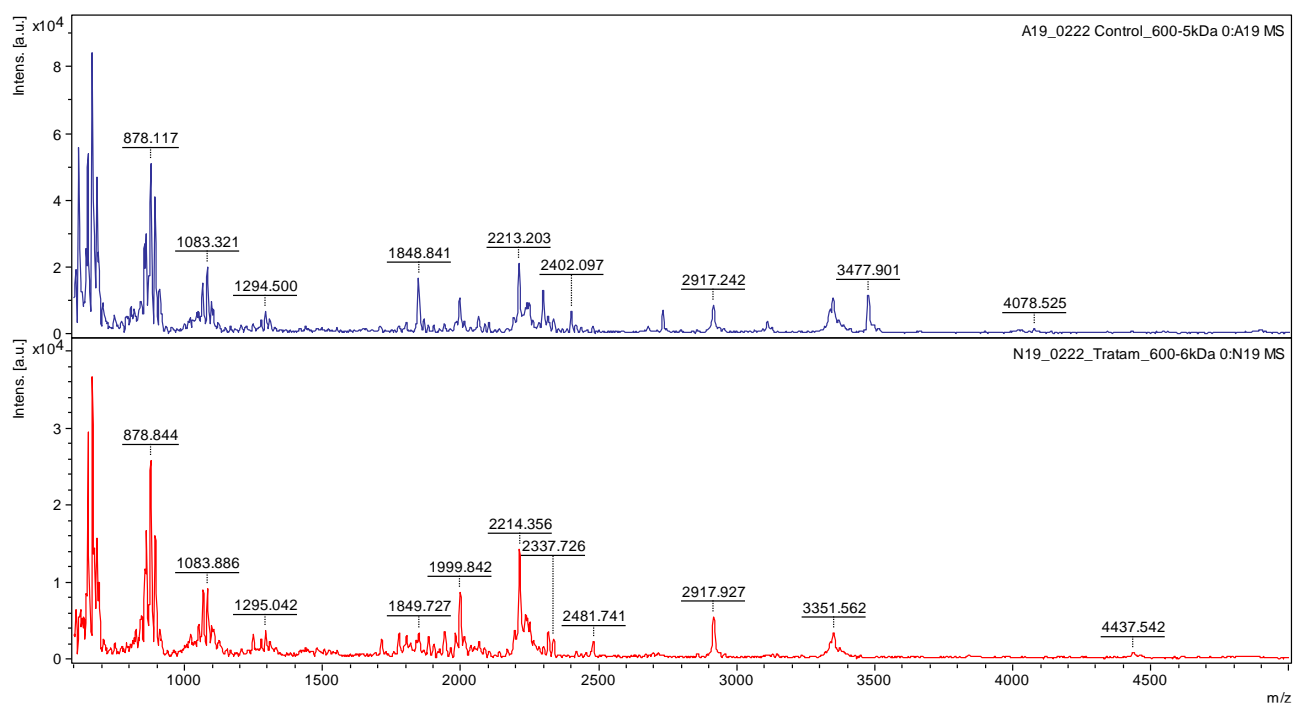
**APÉNDICE B.** Información detallada de la electroforesis bidimensional 2D-PAGE**Figuras B1 y B2.** Geles (réplica 1) de 2D-PAGE de control y tratamiento respectivamente**Figuras B3 y B4.** Geles (réplica 2) de 2D-PAGE de control y tratamiento respectivamente**Figuras B5 y B6.** Geles (réplica 3) de 2D-PAGE de control y tratamiento respectivamente

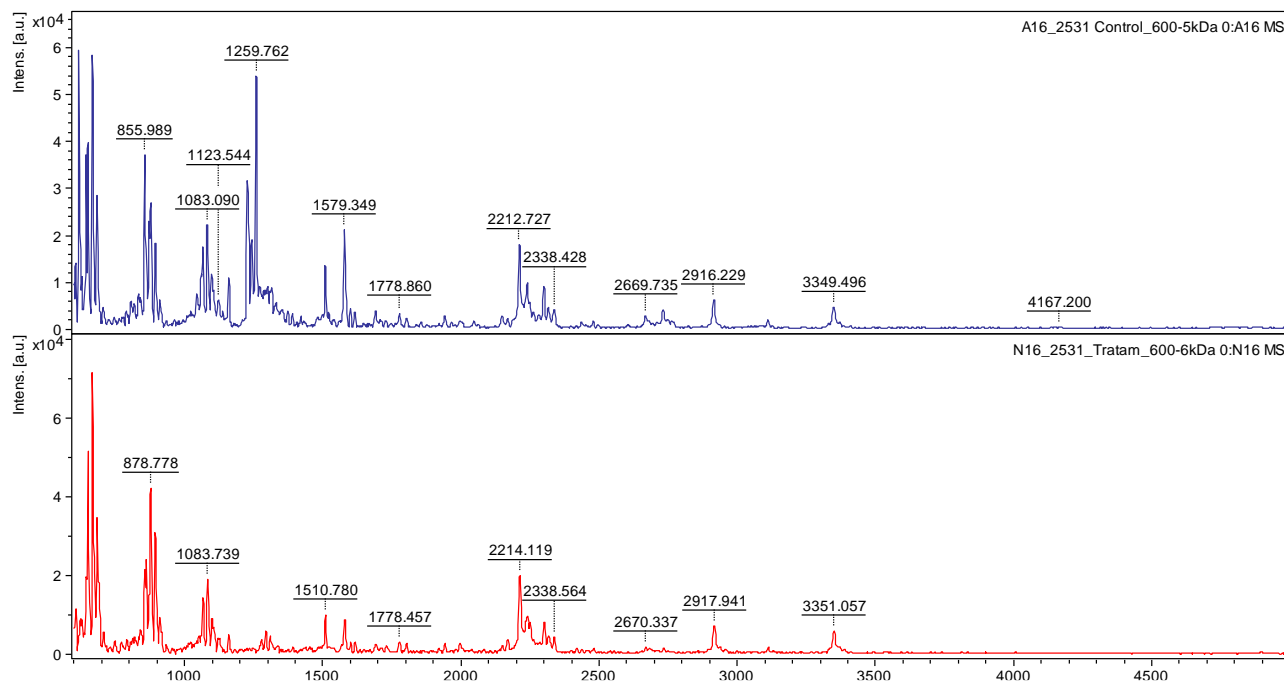
**APÉNDICE C.** Ensayos estadísticos

**Tabla C1.** Pruebas de T-Student y Mann Whitney para spots de Control y Tratamiento

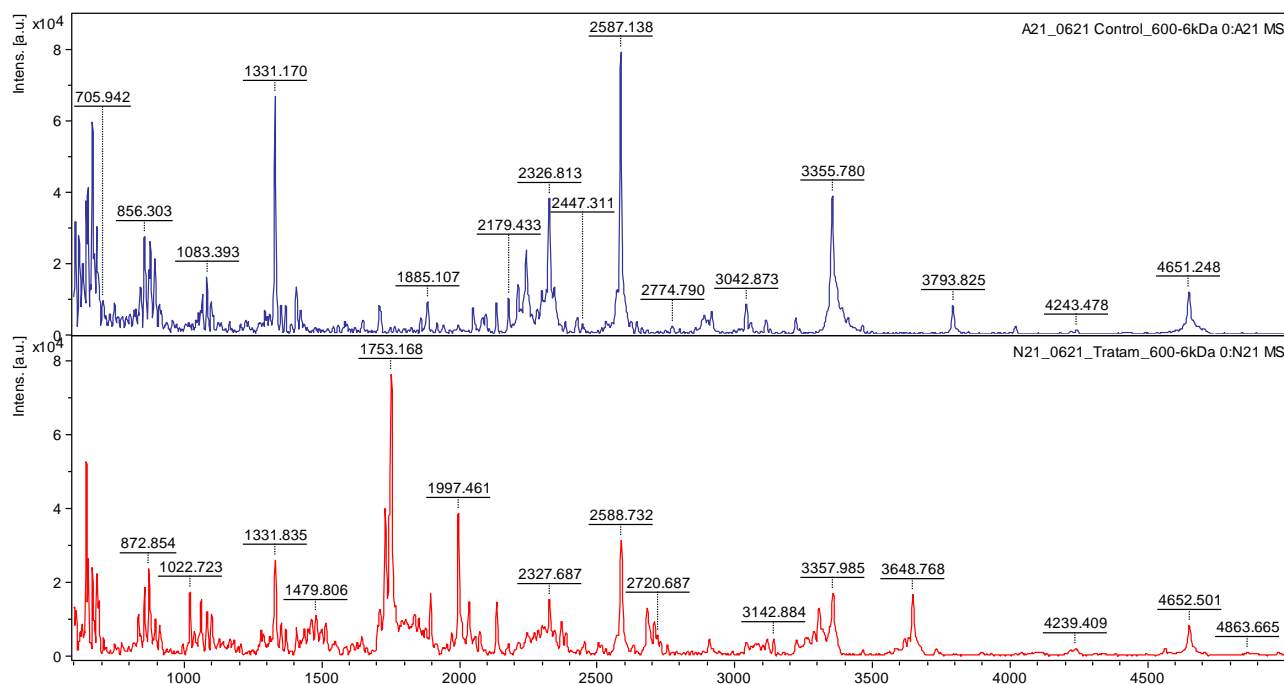
<b>Columna A</b>	<b>Control</b>
<b>Columna B</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>T-Test</b>	
Valor P	0.0004
¿Significativamente diferente (P < 0.05)?	Sí
¿Valor P de una o dos colas?	Dos colas
t, df	t=3,593, df=312
<b>Mann Whitney Test</b>	
Valor P	<0,0001
¿Significativamente diferente (P < 0.05)?	Sí
¿Valor P de una o dos colas?	Dos colas
Suma de rangos en columna A,B	31112 , 18343
U de Mann-Whitney	6253
<b>¿Qué tanta es la diferencia?</b>	
Media de la columna A	579299
Media de la columna B	383207
Diferencia entre medias (A - B) ± SEM	196092 ± 54571
Intervalo de confianza del 95%	88718 a 303466
R cuadrado	0.03974

**APÉNDICE D.** Espectros de masas de calibración**Figura D1.** Espectro de masas de gel de poliacrilamida sin proteína (blanco)**Figura D2.** Espectro de masas de mix de péptidos: Peptide MALDI-MS Calibration Kit 500-3500 Da**Figura D3.** Espectro de masas de la matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA)

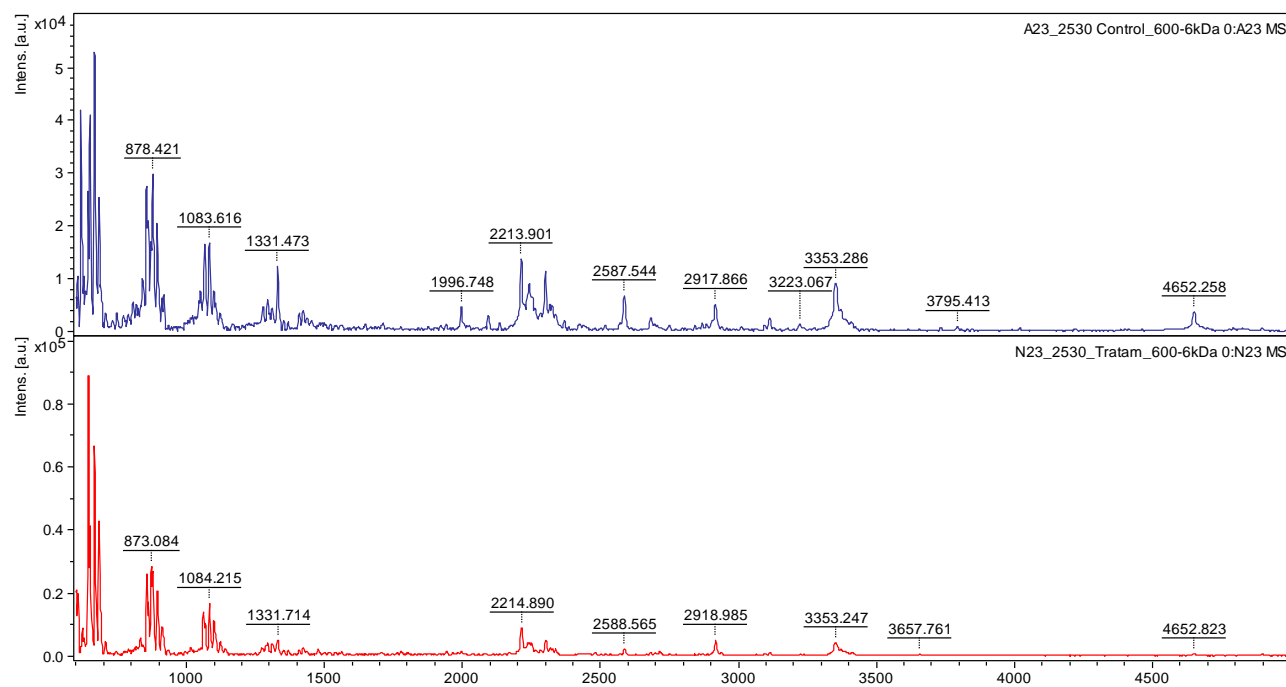
**APÉNDICE E.** Espectros de masas de los spots diferenciales**Figura E1.** Espectro de masas del spot SSP 1127 Control**Figura E2.** Espectros de masas del spot SSP 0222 Control y Tratamiento



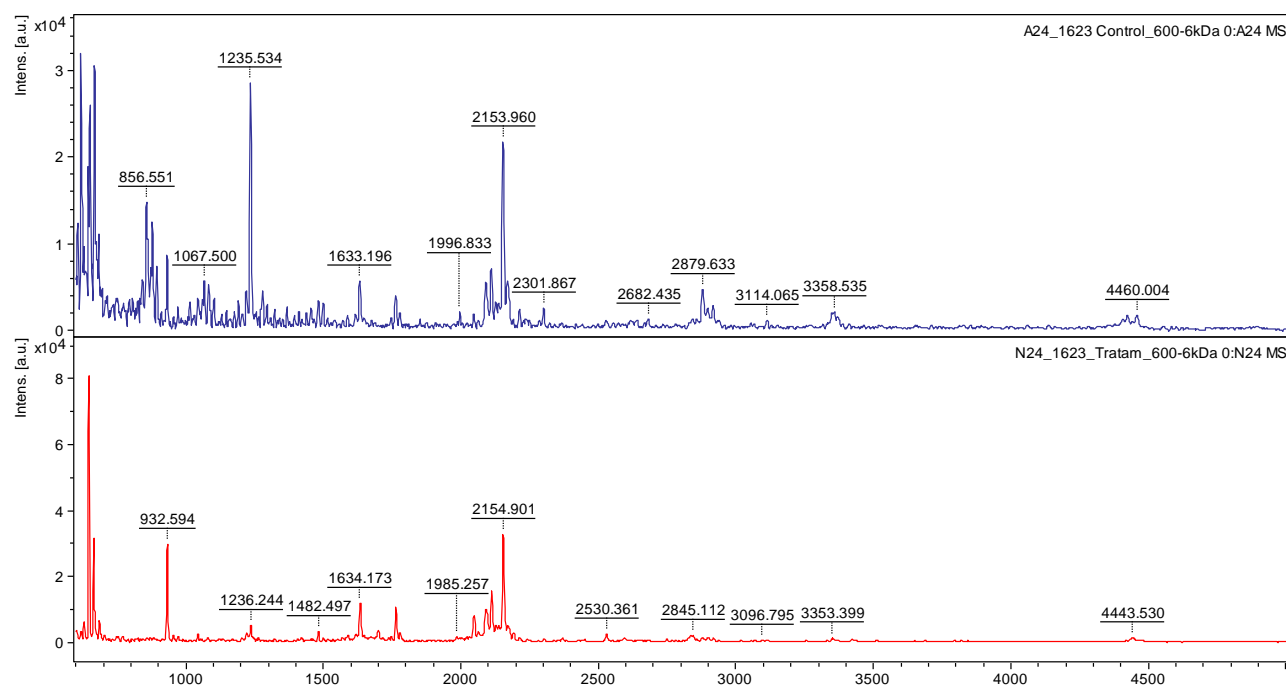
**Figura E3.** Espectros de masas del spot SSP 2531 Control y Tratamiento



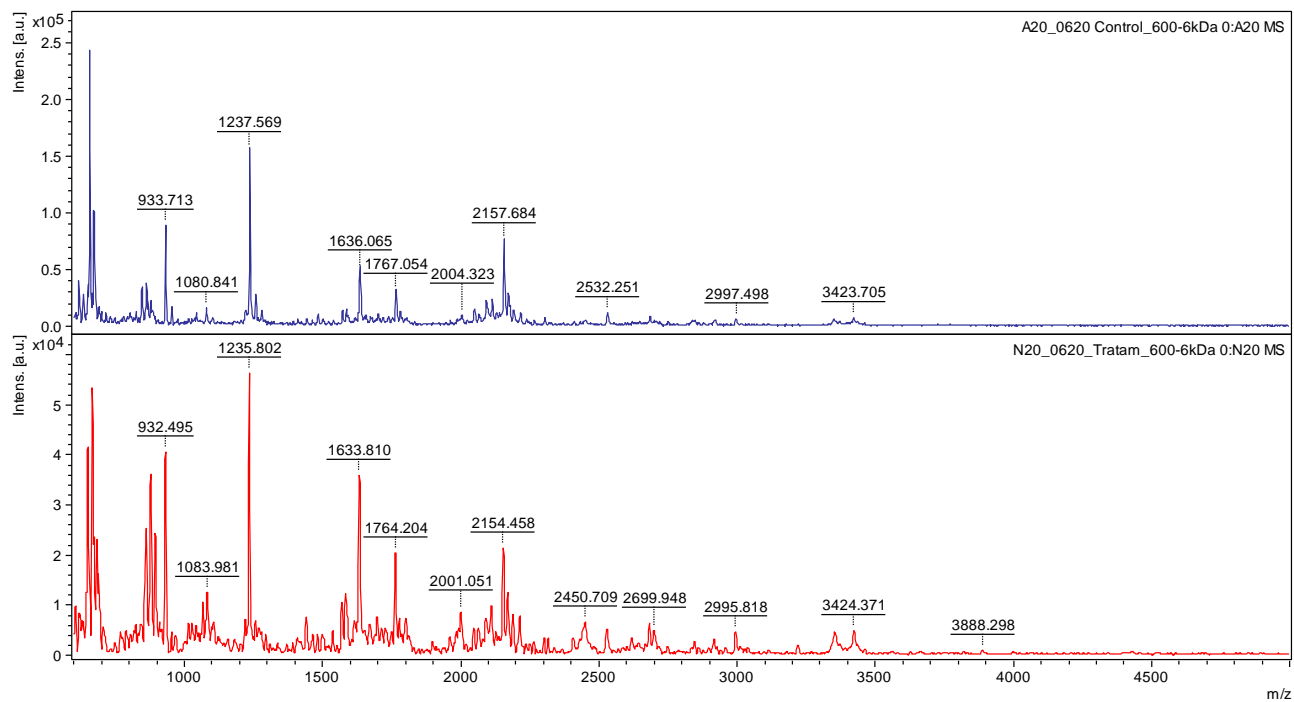
**Figura E4.** Espectros de masas del spot SSP 0621 Control y Tratamiento



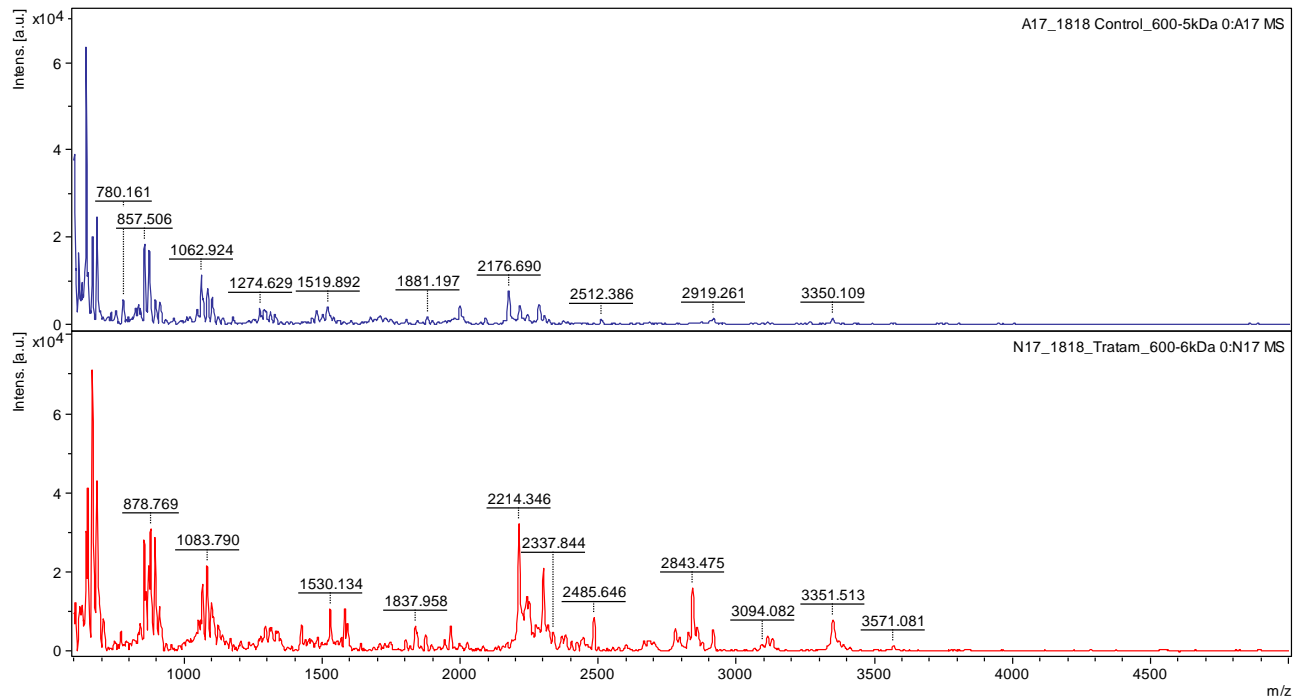
**Figura E5.** Espectros de masas del spot SSP 2530 Control y Tratamiento



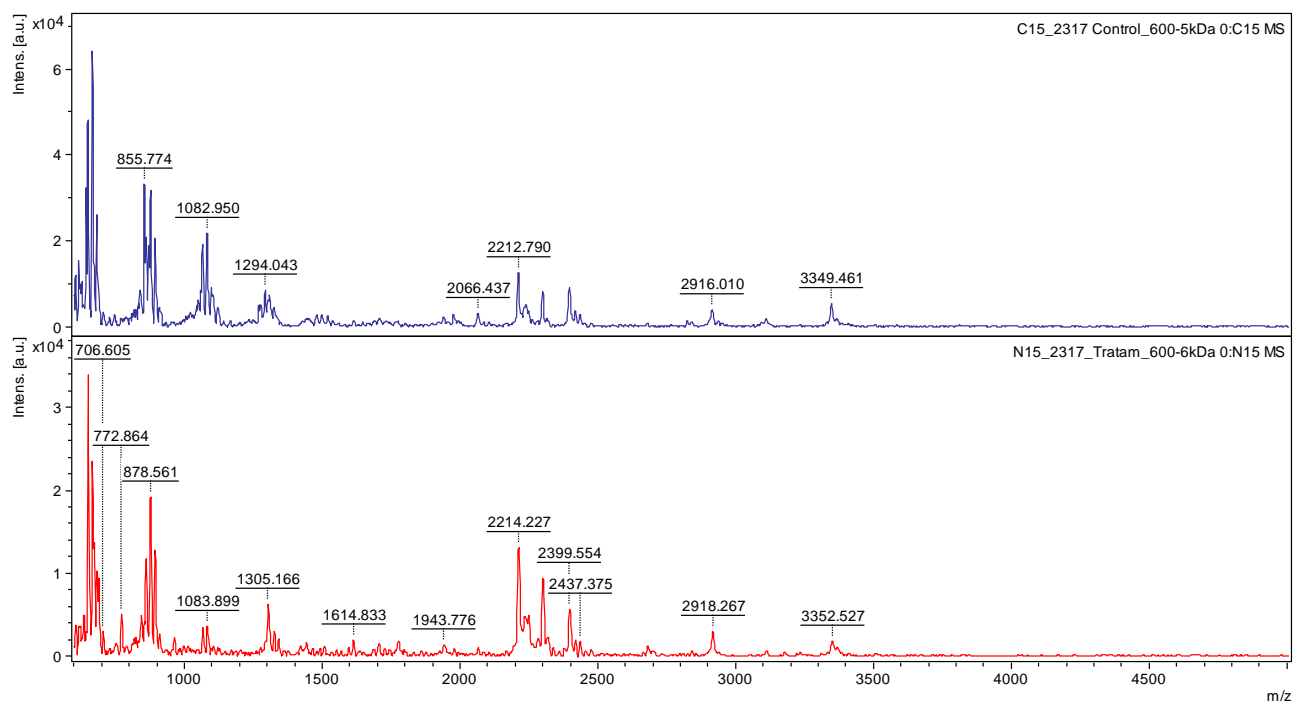
**Figura E6.** Espectros de masas del spot SSP 1623 Control y Tratamiento



**Figura E7.** Espectros de masas del spot SSP 0620 Control y Tratamiento



**Figura E8.** Espectros de masas del spot SSP 1818 Control y Tratamiento



**Figura E9.** Espectros de masas del spot SSP 2317 Control y Tratamiento

## APÉNDICE F. Información detallada de la identificación de proteínas en MASCOT

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

**Protein View: TTCA\_AZOSB**

tRNA-cytidine(32) 2-sulfurtransferase OS=Azoarcus sp. (strain BH72) OX=418699 GN=ttcA PE=3 SV=1

Database: SwissProt  
 Score: 71  
 Expect: 0.014  
 Monoisotopic mass ( $M_r$ ): 34200  
 Calculated pI: 6.02  
 Taxonomy: **Azoarcus olearius**

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of TTCA\\_AZOSB against nr.](#)

**Search parameters**

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
 Fixed modifications: **Carboxymethyl (C)**.  
 Mass values searched: 60  
 Mass values matched: 14

**Protein sequence coverage: 69%**

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MEAVAPSAE SRHSNTFLRL KKKLERGVGE AIADYNMIGD GDTVMVCVSG
51 GKDSYILLSC LLALRERAFV DFRIVAMNLD QKQPGFPDDV LPAYFESIGV
101 EYRIVTEDTY SIVKDKIPEG KTTCSLCSRL RRGIIYRTAK EIGATRIALG
151 HRDDMLETL FLNMFPGKI KAMPKLVSD DGQHVIRPL AYCENDIER
201 FARGMDFPII PCNLGSGQEN AQRQIKTML QGWARDYPGR IESLATSLRN
251 VVPSHLSDSA LFDFVGLTRD TRVGEQDTVF DPPELPAAAA PITLRADDD
301 GDRSAT

```

**Figura F1.** Búsqueda en MASCOT del espectro 0621

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

**Protein View: Y2273\_PSEA6**

PKHD-type hydroxylase Patl\_2273 OS=Pseudoalteromonas atlantica (strain T6c / ATCC BAA-1087) OX=3042615 GN=Patl\_2273 PE=3 SV=1

Database: SwissProt  
 Score: 63  
 Expect: 0.09  
 Monoisotopic mass (M<sub>r</sub>): 25374  
 Calculated pI: 7.85  
 Taxonomy: Paraglaciecola sp. T6c

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of Y2273\\_PSEA6 against nr.](#)

**Search parameters**

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Mass values searched: 38  
 Mass values matched: 9

**Protein sequence coverage: 66%**

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MLTVIEDLLS KKEVTQFTQA LDKGQWLDGK HTAGSQASKV KYNQQLDDGS
51 ALALELRNTV IRKLSGNALF MSSALPNKIY PPKFNRYQGG EHYGLHVDAS
101 VMPIPNSHQM LRTDLSATLF LSEPKTYDGG ELSIETQFGL QQIKLNAGSV
151 ILYPANSLHQ VNPVTKGRRR ASFFWIESLV RSNDQRSMLF DLDQSIQALT
201 VELGSNDAEV KRLTGVVYHNL MRSWAIC

```

**Figura F2.** Búsqueda en MASCOT del espectro 1623

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

**Protein View: PANC\_XANOM**

Pantothenate synthetase OS=Xanthomonas oryzae pv. oryzae (strain MAFF 311018) OX=342109 GN=panC PE=3 SV=1

Database: SwissProt  
 Score: 43  
 Expect: 9.9  
 Monoisotopic mass (M<sub>r</sub>): 30588  
 Calculated pI: 5.13  
 Taxonomy: Xanthomonas oryzae pv. oryzae MAFF 311018

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of PANC\\_XANOM against nr.](#)

**Search parameters**

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Mass values searched: 43  
 Mass values matched: 7

**Protein sequence coverage: 42%**

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MIQTLTDLISA LRALVNGWKR EGLRVALVPT MGNLHVGHYS LVMLARQYAD
51 RVVSSVFVNP TQFGPNEDFA CYPRTPEADL RGLDAGCDA LWLPDVTMY
101 PLGTALATPI HAPGVSDVLE GECRPGHFDG VCTVVARLFN QVQPDVAAPG
151 KKDYQQLAVI RQMVADLAPP IEILGGSIVR EADGLAMSSR NQYLSAEERP
201 TSANIHKVLL QMRDSYAVGT PRAQVEDAAS HALEQAGFRV DYAVVRLPDL
251 SEPGDGHTEA HVALIAARLG STRLIDNLEF

```

**Figura F3.** Búsqueda en MASCOT del espectro 2530

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

**Protein View: RL7\_FRATF**

Large ribosomal subunit protein bL12 OS=Francisella tularensis subsp. holarctica (strain FTNF002-00 / FTA) OX=458234 GN=rplL PE=3 SV=1

Database: SwissProt  
 Score: 48  
 Expect: 2.9  
 Monoisotopic mass (M<sub>r</sub>): 12897  
 Calculated pI: 4.62  
 Taxonomy: Francisella tularensis subsp. holarctica FTNF002-00

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of RL7\\_FRATF against nr](#).

**Search parameters**

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Variable modifications: Oxidation (M)  
 Mass values searched: 75  
 Mass values matched: 9

**Protein sequence coverage: 89%**

Matched peptides shown in **bold red**.

1 **MAITKEDILN AVAEMSVMDV CDLVKMMEDK FGVSAAAAVA VAAGPVAGPV**  
 51 **EAAEEKTEFD VVLVDAGSNK IAAIKAVRGA TGLGLKEAKD AVEGTPFTVK**  
 101 **EASKEEAEA LKQLEEAGA KVELK**

**Figura F4.** Búsqueda en MASCOT del espectro 1127

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

**Protein View: RNH2\_CLOB8**

Ribonuclease HII OS=Clostridium beijerinckii (strain ATCC 51743 / NCIMB 8052) OX=290402 GN=rnhB PE=3 SV=1

Database: SwissProt  
 Score: 57  
 Expect: 1  
 Monoisotopic mass (M<sub>r</sub>): 31030  
 Calculated pI: 8.22  
 Taxonomy: Clostridium beijerinckii NCIMB 8052

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of RNH2\\_CLOB8 against nr](#).

**Search parameters**

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Mass values searched: 48  
 Mass values matched: 16

**Protein sequence coverage: 68%**

Matched peptides shown in **bold red**.

1 **MIQFNEDIRS LSF AEIKEEI HKLSIVDL YR NDEHTK LINW LEEDK RKNVL**  
 51 **SLRKEIERDL ESYLNEVKRV KTYEFDKSF GSYRYIAGVD EVGRGELAGP**  
 101 **IVACSVILDL NVLEKDLILY INDSKKVKEH KREELSEI IK EKALSYQI AV**  
 151 **SSNKEIDEKG IAFANNK VFL ESCNSLSIKP DLVLS DGYLI KNIGIENKSV**  
 201 **IKGDTKSASI AAASIVAKVY RDRLMKEYAK KYPHYDFENN VGYGTSKHIE**  
 251 **GLKKY GKS DI HRNSFLTKLL**

**Figura F5.** Búsqueda en MASCOT del espectro 2531

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

**Protein View: RRF\_PSEMY**

Ribosome-recycling factor OS=Pseudomonas mendocina (strain ymp) OX=399739  
GN=frr PE=3 SV=1

Database: SwissProt  
Score: 57  
Expect: 0.39  
Monoisotopic mass (M<sub>r</sub>): 20188  
Calculated pI: 6.77  
Taxonomy: Pseudomonas mendocina ymp

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of RRF\\_PSEMY against nr.](#)

**Search parameters**

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
Fixed modifications: Carboxymethyl (C)  
Mass values searched: 100  
Mass values matched: 13

**Protein sequence coverage: 58%**

Matched peptides shown in **bold red**.

1 **MINDIKKDAQ** ERMGKSLEAL DRNLSASIRTG RAHPSILDSV KVPAWGSDMP  
51 **LNQVAAITVE** DARTLKIVAH DKNLSAAIEK AIMTSDLGLN PSSAGTTIRV  
101 **PMPALTEETR** KGYTK**Q**ARGV AEDAKVAVRN VRRDALAELK KLAKAKEISE  
151 DEERRAADEL QKITDKFIAD VDKALEV**KEA** DIMAV

**Figura F6.** Búsqueda en MASCOT del espectro 0222

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

**Protein View: NUOC\_BARHE**

NADH-quinone oxidoreductase subunit C OS=Bartonella henselae (strain ATCC 49882 / DSM 28221 / CCUG 30454 / Houston 1) OX=283166 GN=nuoC PE=3 SV=1

Database: SwissProt  
Score: 54  
Expect: 0.75  
Monoisotopic mass (M<sub>r</sub>): 23841  
Calculated pI: 5.13  
Taxonomy: Bartonella henselae str. Houston-1

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of NUOC\\_BARHE against nr.](#)

**Search parameters**

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
Fixed modifications: Carboxymethyl (C)  
Mass values searched: 40  
Mass values matched: 9

**Protein sequence coverage: 77%**

Matched peptides shown in **bold red**.

1 **MSESLEELAA** YLKSKLGDKL EETVLAFGEL TIVSRDAIT DVLIFVRDSS  
51 **RCQFINITDI** SGVDYPCRDK RFDVSYQLLS PRHNLRLRVK VRTDENIPVA  
101 **SACSIYPGAE** WYERETYDMY GILFSGHPDL RRILTDYGFPE GHPLRKDFPV  
151 **TGFVECRYDN** EAKRVIYEPV VLRQEMRNFDFLSPWEGAQY ILPCDEKTKD  
201 KR

**Figura F7.** Búsqueda en MASCOT del espectro 0620

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

**Protein View: RL30\_EDWI9**

**Large ribosomal subunit protein uL30 OS=Edwardsiella ictaluri (strain 93-146)  
OX=634503 GN=rpmD PE=3 SV=1**

Database: SwissProt  
 Score: 50  
 Expect: 6.4  
 Monoisotopic mass ( $M_r$ ): 6540  
 Calculated pI: 10.59  
 Taxonomy: Edwardsiella ictaluri 93-146

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of RL30\\_EDWI9 against nr.](#)

**Search parameters**

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Mass values searched: 30  
 Mass values matched: 6

**Protein sequence coverage: 69%**

Matched peptides shown in **bold red**.

1 **MAKTIK**IT**QT **RSAIGRLPKH** **KATLLGLGLR** RIGHTVERED TPAVRGMINA**  
 51 **VSYMVKVEE**

**Figura F8.** Búsqueda en MASCOT del espectro 1818

**MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results**

**Protein View: EFP\_STUS1**

**Elongation factor P OS=Stutzerimonas stutzeri (strain A1501) OX=379731 GN=efp  
PE=3 SV=1**

Database: SwissProt  
 Score: 50  
 Expect: 2.1  
 Monoisotopic mass ( $M_r$ ): 21222  
 Calculated pI: 4.86  
 Taxonomy: Stutzerimonas stutzeri A1501

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of EFP\\_STUS1 against nr.](#)

**Search parameters**

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Mass values searched: 30  
 Mass values matched: 8

**Protein sequence coverage: 61%**

Matched peptides shown in **bold red**.

1 **MKTAQEFRAG** **QVAIINGAPW** **VIQKAEFNKS** GRNSAVVKMK LKNLLNGSAT  
 51 **ETVYKADDKL** EPVILERKEV TYSYFADPLY VFMDNEFNQY EIEKDDLEGV  
 101 MTFIEDGMID VCEAVFYNDK **VISVELPTTI** **VREIAYTEPS** **VRGDTSGKVM**  
 151 **KTARLKGAE** **LQVSAPCEIG** **DSIEIDTRTG** **EYKSRVKA**

**Figura F9.** Búsqueda en MASCOT del espectro 2317