

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

19

LAS CATALASAS Y LA DIFERENCIACION  
CELULAR EN *Bacillus cereus*

292538

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A:

BIOL. MARIA ESTHER / RUBIO RUIZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN

MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edgardo Escamilla por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio.

A mi comité de sinodales por darse el tiempo para revisar y corregir esta tesis.

A Héctor, por ser mi amigo, apoyo y pareja. Por su ayuda y comprensión durante el desarrollo de mi maestría y por su valiosa paciencia y colaboración con sus conocimientos en computación para terminar esta tesis. TE AMO y sabes que este logro es de los dos (y de Diego).

A mis padres y hermanos, así como el resto de mi familia. Gracias a ustedes soy lo que soy. Gracias por su cariño y apoyo para lograr esta meta que les pertenece también a ustedes.

A mis compañeros del laboratorio 101 ote del instituto de Fisiología Celular: Fernando, Juan M., Germán, Juan X., Marcos, Bernardo, Miguel Angel Maldonado, Miguel Angel Dominguez, Lucha, Luz, Marcela, Vero, Paty, Juan Luis, Martín.....Gracias a todos por su amistad y por hacer del laboratorio algo más que un lugar de trabajo. Gracias por compartir esas parrandas, partidos de fut y cenas en "La Habana" y por seguir siendo mis cuates.

Al Sr. Juan Manuel Méndez Franco por su amistad y valiosa colaboración y ayuda técnica en la preparación de mis cultivos, en el manejo de los fermentadores. En fin, en todo momento en que necesité tu ayuda ahí estabas siempre dispuesto. Mil gracias Juanito!

Al M. C. Pablo Rangel Silva le agradezco sus valiosos consejos y ayuda técnica para la realización de este trabajo, sin ellos no hubiera podido salir adelante. Agradezco también a los compañeros del laboratorio 103 Ote, los cuales también me facilitaron las cosas en momentos de dificultades: gracias Yésica, Adelaida, Miguel y Fernando.

A todos los amigos que encontré en el IFC, saben que los aprecio mucho.

Gracias a mis amigos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por seguirme apoyando hasta el final de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la dirección general de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) por otorgarme la beca para la realización de mis estudios de posgrado.

## INDICE

INDICE.....	I
RESUMEN.....	III
TABLA DE ABREVIATURAS.....	IV
1.INTRODUCCION.....	1
1.1 Diferenciación celular.....	1
1.2 Ciclo de vida de <i>Bacillus cereus</i> .....	1
1.2.1 La espora y la germinación en <i>Bacillus</i> .....	4
1.3 Especies de oxígeno reactivas en los sistemas biológicos (EROS).....	4
1.3.1 Producción de las EROS en los sistemas biológicos.....	5
1.3.2 Mecanismos de transformación de las EROS en los sistemas biológicos.....	6
1.4. Mecanismos enzimáticos antioxidantes: las catalasas.....	7
1.4.1 Catalasas en las bacterias.....	7
1.4.2 Catalasas en el género <i>Bacillus</i> .....	8
1.5. Estrés oxidativo y diferenciación celular.....	9
2.OBJETIVOS.....	11
1.4 Objetivo general.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 Material químico.....	12
3.2 Material biológico.....	12
3.2.1 Obtención de células en los medios de cultivo.....	12
3.2.2 Obtención de esporas sin tegumento.....	13
3.2.3 Obtención de células primarias.....	13
3.3 Ruptura de las células.....	14
3.4 Obtención de fracciones semipuras de las diferentes catalasas de las esporas.....	14
3.4.1 Extracción de la catalasa del tegumento (spo-teg).....	14
3.4.2 Purificación parcial de la catalasa del protoplasto de la espora (spo-prot).....	15
3.5. Determinación de la concentración de proteína.....	16
3.6. Determinación de la actividad específica y total de catalasa (Método polarográfico).....	16
3.7. Inhibición con azida de sodio, cianuro de potasio y 3, amino1,2,4 triazol.....	17
3.8 Efecto del pH sobre la actividad de catalasa.....	17
3.9 Determinación de la actividad de peroxidasa con varios sustratos.....	17
3.10 Electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida.....	17
3.10.1 Isoelectroenfoco.....	18
3.10.2 Determinación de catalasa y peroxidasa mediante zimogramas.....	18
4.RESULTADOS.....	19
4.1 Curva de crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> .....	19
4.2 Variaciones en la actividad de catalasa durante el crecimiento logarítmico y el proceso de esporulación de <i>B. cereus</i> .....	19
4.3 Identificación de isoenzimas de catalasa.....	20
4.4 Determinación del punto isoeléctrico.....	21
4.5 Determinación de la $K_M$ y $V_{max}$ de las diferentes catalasas.....	22
4.6 Inhibición de las catalasas con azida de sodio, cianuro y 3-aminotriazol.....	23
4.7 Determinación del pH óptimo de las catalasas de <i>B. cereus</i> .....	25
4.8 Determinación de la actividad de peroxidasa.....	26
4.8.1 Espectrofotométricamente.....	26
4.8.2 Zimograma.....	27
4.9 Obtención de fracciones semipuras de las diferentes catalasas de las esporas.....	27

4.9.1	Purificación parcial de la catalasa del protoplasto de la espora (spo-prot).....	27
4.9.2	Extracción de la catalasa del tegumento (spo-teg).....	29
4.9.3	Inhibición de las catalasas con azida, cianuro y 3-aminotriazol.....	30
4.9.4	Determinación del pH óptimo.....	32
4.10	Papel de la catalasa spo-teg en la germinación y el crecimiento logarítmico.....	33
4.10.1	Germinación.....	33
4.10.2	Actividad de catalasa en medio de cultivo G2x.....	34
4.10.3	Actividad de catalasa en medio mínimo con germinantes.....	34
5.	DISCUSIÓN.....	35
6.	CONCLUSIONES.....	40
7.	REFERENCIAS.....	41

## RESUMEN

Se han detectado algunos cambios en la actividad y el patrón de expresión de las isoenzimas de catalasa en varios microorganismos tomando en cuenta a la diferenciación celular. Con base en varias características bioquímicas, se han descrito dos familias de catalasas: las catalasas típicas y las catalasas-peroxidasas. La actividad de las primeras es independiente del pH (en valores de 5 a 11), son resistentes al tratamiento con disolventes como el cloroformo y el etanol y se inhiben específicamente con el 3-aminotriazol. La segunda familia tiene las dos actividades: de catalasa y de peroxidasa, su actividad de catalasa es dependiente del pH, son inactivadas por cloroformo y etanol y son más sensibles a la temperatura que las catalasas típicas.

En este trabajo se identificó en *Bacillus cereus* la presencia de dos catalasas que tienen diferente movilidad electroforética. La más rápida es la catalasa vegetativa (cat-veg), que está presente durante el crecimiento exponencial e incrementa su actividad en el proceso de maduración de la espora. En las esporas se encuentran tanto la cat-veg como la catalasa más lenta exclusiva de la espora spo-prot, la primera asociada al exosporio o tegumento (por lo que se le denominó spo-teg) y la segunda en el protoplasma.

Tanto la cat-veg como la catalasa spo-teg pertenecen al grupo de las catalasas típicas y nuestros datos sugieren que podría tratarse de la misma enzima.

La catalasa del protoplasma de la espora presenta además actividad de peroxidasa con diferentes sustratos artificiales por lo que pertenece al tipo de las catalasas-peroxidasas. Esta enzima se empieza a sintetizar al final del proceso de esporulación.

### TABLA DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
CAT	catalasa
Cat spo-prot	catalasa del protoplasto de la espora
Cat spo-teg	catalasa del tegumento de la espora
Cat-veg	catalasa del crecimiento vegetativo
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EROS	especies reactivas de oxígeno
FAD	flavina adenina dinucleótido
FMN	flavina mononucleótido
g	fuerza centrífuga relativa
HPI	hidroperoxidasa I
HPII	hidroperoxidasa II
kDa	kilodaltones
mA	miliamperios
MES	ácido 2-N morfolina etanolsulfónico
NADH	$\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	$\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
ND	no detectada
natO <sub>2</sub>	nanoátomos gramo de oxígeno
P.I.	punto isoeléctrico
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
pp	precipitado
rpm	revoluciones por minuto
SOD	superóxido dismutasa
Spo-tot	esporas totales
ss	sobrenadante
$\sigma$	factor sigma
TEMED	N,N,N',N', tetrametiletilenediamina

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Diferenciación celular

La diferenciación celular se define como el proceso por el cual el mismo genoma origina dos células diferentes en su composición química, morfológica y en su función (Kenyan y Sandler, 1984).

Durante la diferenciación celular pueden ocurrir cambios en la topología del ADN y la presencia de algunas proteínas que lo estabilizan lo que le da una conformación que le permite tener una transcripción selectiva.

La esporulación y germinación bacteriana son modelos típicos de diferenciación celular que se empezaron a estudiar en 1950. En ellos se observó que las células esporulantes sintetizan ARNm y proteínas que no se encuentran en las células vegetativas mientras que, algunas moléculas vegetativas desaparecen de manera temprana en el proceso de esporulación; en particular, varios factores sigma juegan un papel muy importante en la regulación de la transcripción del proceso de la diferenciación (Galizzi y col., 1978).

En los años recientes la esporulación bacteriana se ha estudiado como modelo para analizar la diferenciación celular investigando los mecanismos regulatorios a nivel transcripcional y traduccional de la expresión génica, la cual tiene que ver directamente con la transición de una célula vegetativa a una espora (Ohyama y col., 1978).

La mayoría de los conocimientos que se tienen acerca de los mecanismos que intervienen en los procesos de la esporulación y la germinación, así como de los factores que determinan las propiedades de las esporas se han obtenido de algunos representantes del género *Bacillus*, en los cuales dichos procesos y factores son similares (Setlow, 1981).

El género *Bacillus* tiene un ciclo de vida corto y se tiene un conocimiento detallado del mismo, es de fácil manipulación, se puede trabajar con una etapa determinada del desarrollo y permite aislar a la endospora de la célula madre y estudiar a los compartimentos durante la esporulación (Andreoli, y col., 1973).

El crecimiento logarítmico y la subsecuente formación de la endospora en las especies de *Bacillus* involucra una gran serie de eventos bioquímicos. Es por ello que, la esporulación bacteriana provee un sistema de diferenciación celular que ha tenido un gran valor para el estudio de las relaciones entre la morfología y la bioquímica de dicho proceso (Andreoli, y col. 1973).

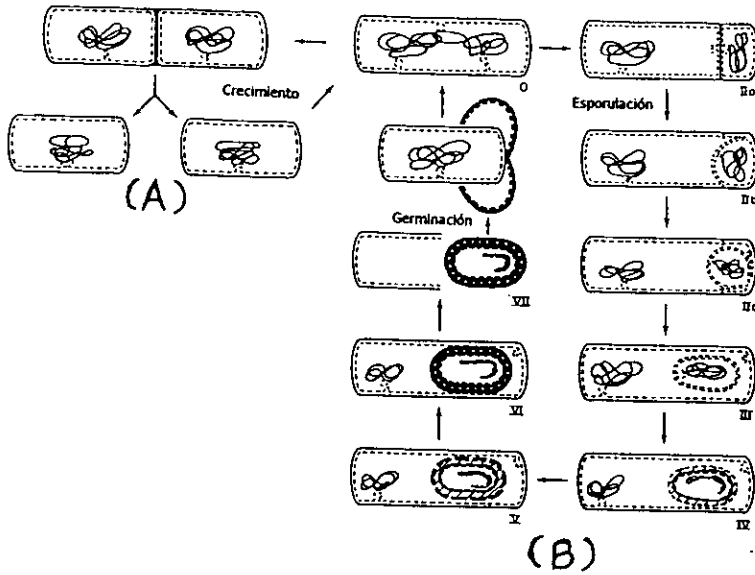
### 1.2 Ciclo de vida de *Bacillus cereus*

Las especies de *Bacillus* se clasifican en tres grupos de acuerdo a la morfología de su espora. *Bacillus cereus* es una bacteria esporulante Gram positiva clasificada dentro del grupo I por su espora elipsoidal con posición central, vive en el suelo, es aerobia facultativa y mesófila con un crecimiento óptimo a 32°C (Priest, 1989).

Un cultivo de *Bacillus* presenta diferentes etapas. La primera de ellas es la etapa de adaptación (lag) que corresponde a la fase en el que las células se acondicionan al medio y no hay reproducción bacteriana. Posteriormente, la población crece de manera exponencial debido a la abundancia de nutrientes; a esta etapa se le denomina logarítmica (log) y se caracteriza porque las células presentan poca movilidad y se organizan en cadenas largas.

A lo largo de la fase exponencial se encuentran reprimidos los genes que codifican para la síntesis de enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Por ello, cuando *Bacillus* crece en un medio con glucosa como fuente de carbono, se da una acumulación de piruvato y acetato lo que ocasiona que el pH del medio baje y alcance valores entre 5 y 6 (Hanson, y col., 1963).

El proceso de la esporulación se da cuando las condiciones del medio ya no son aptas para soportar el crecimiento logarítmico y se ha dividido en distintos estados morfológicos sugerido por Ryter (1965):



**Figura 1.1.** Ciclo de vida del género *Bacillus*. A) Crecimiento vegetativo. B) Ciclo de la esporulación y la germinación. Estado 0. La célula detiene su crecimiento y se forma el filamento axial del ADN. En el estado IIa se construye el septo asimétrico para la formación de los dos compartimentos celulares independientes. En el estado IIb comienza el engullimiento de la preespora, para completarlo en el estado III y rodearse de una segunda membrana con polaridad inversa a la primera. Estado IV: se da la formación de la corteza entre estas membranas. En el estado V se forman las cubiertas de proteínas. La espora completa su maduración en el estado VI y es liberada debido a la lisis de la célula madre en el estado VII. La germinación ocurre después de que la espora se activa y se pone en contacto con los germinantes. Cuando se encuentra en el medio propicio, ésta crece y se divide por bipartición.

En el estado I, la célula detiene el crecimiento y el material genético se compacta formando un filamento. La formación de este filamento ocurre en ausencia de síntesis de proteínas y parece ser un rearrreglo de la molécula de ADN posiblemente causada por un cambio en la fuerza iónica en la célula cuando ésta enfrenta la inanición.

Estado II: formación del septo. Ocurre la división celular asimétrica, el cual es el evento morfológico que caracteriza la secuencia del desarrollo del proceso de esporulación. Cada uno de los dos segmentos del protoplasma que se han separado por la división celular contiene la mitad del ADN de la célula original (Fig. 1.1)

Estado III: formación de la corteza. El septo crece alrededor de la pequeña célula formada, hasta su completo engullimiento y se fusiona para formar una doble membrana. Esta membrana tiene polaridad inversa a la membrana plasmática de la célula madre; este es el estado crítico que obliga a la célula a esporular (Freese, 1981). El exosporio o integumento se forma poco tiempo después de que se complete el engullimiento de la espora con la apariencia de una vesícula sobre el exterior de la membrana externa de la forespora mientras se desarrolla la corteza. Esta estructura es la entidad que separa a la célula del medio, puede ser removida fácilmente y tiene una composición lipoproteica similar a la de las membranas además de contener: 10.4% de azúcares y 11.2% de glucosamina y una parte no hidrolizable compuesta de carbohidratos degradados (Freese y Heinze, 1984).

Estado IV: Entre las dos membranas se forma la corteza que está hecha de peptidoglicanos que son diferentes a los que forman la pared celular. La síntesis de la corteza se lleva a cabo por dos enzimas espora-específicos, la D-ácido glutámico mesodiamino ácido pimélico hidrolasa (que está unida a la membrana) y la UDP-N ácido acetilmurámico L-alanina D-ácido glutámico meso-diaminopimélico (DPM) ligasa (que es una proteína citoplasmática). La DPM ligasa se sintetiza en la célula madre en el momento apropiado. Así también, se inducen enzimas vegetativas en la célula madre que están involucradas en la formación de la pared celular.

Estado V: Se ensambla la cubierta de proteínas en la parte superior de la membrana externa. La cubierta contiene el 40-50% de todas las proteínas de la espora y está compuesta de proteínas con un alto contenido de grupos sulfuro y son espora-específicos. La cubierta consiste principalmente de una proteína con peso molecular de 13 000 Da. Esta proteína se deriva de la proteólisis de un precursor con PM de 65 000 Da. Esta capa es la que confiere a la espora la resistencia a los disolventes orgánicos y enzimas líticas. El ácido dipicolínico es el componente bacteriano que sugiere como participante en la latencia y la resistencia al calor; se almacena desde esta fase de esporulación en adelante y se expulsa inmediatamente después de la adición de los germinantes (Freese y Heinze, 1984).

Etapa VI: en esta etapa la cubierta externa se deposita sobre la superficie de la cubierta interna que consta también de una capa proteica.

Finalmente, la espora es expulsada de la célula madre y entonces se le denomina espora libre (Fig. 1.2).

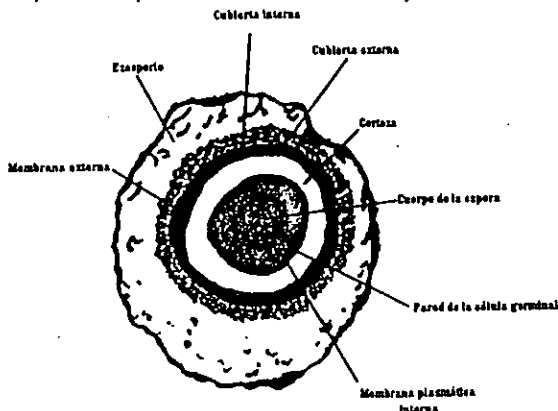


Figura 1.2. Esquema de la espora de *Bacillus cereus*.

### 1.2.1. La espora y la germinación en *Bacillus*

Las esporas son formas celulares especializadas que muestran un alto grado de resistencia a diferentes condiciones ambientales. La transición de una espora latente a una célula vegetativa metabólicamente activa, representa un modelo en el que se puede estudiar la bioquímica y la genética del proceso de diferenciación celular (Galizzi y col., 1978).

La transformación de esporas a células vegetativas se da en 3 procesos distintos y secuenciales: la activación, la germinación y la emergencia (outgrowth).

La activación es un proceso reversible, es el final de la latencia y es el producto de la acción de tratamientos que capacitan a la célula para que germine más rápido. La activación se puede inducir con calor, por la acción de detergentes o por la exposición a pH bajos.

La germinación consiste en una serie de reacciones degradativas que aparentemente terminan con el estado de latencia e inicia el metabolismo celular. La inducción de la germinación se puede dar por L-alanina para *Bacillus subtilis* y L-alanina y adenosina, para *B. cereus*. En presencia de una mezcla de sales inorgánicas, esas sustancias inician la germinación pero no el crecimiento (Kenynan y Sandler, 1984).

La germinación es la pérdida irreversible de las propiedades de las esporas. Durante este proceso se pierde primero la resistencia al calor, después el ácido dipicolínico y el calcio se liberan al medio y la espora pierde refringencia; la germinación se induce por los germinantes (alanina y adenosina) y el crecimiento ocurre en un medio mineral más glucosa.

La emergencia es la transformación de una espora germinada en una célula vegetativa por lo que se considera un proceso de diferenciación en el que participan genes específicos que se expresan durante este paso, los cuales no tienen un papel durante el crecimiento regular. La emergencia depende de la presencia de varios aminoácidos y la transcripción comienza inmediatamente después de la germinación (Kenynan y Sandler, 1984).

Posteriormente, entra agua a la célula y ésta se hincha, el metabolismo se activa por inicio de la respiración y se acumulan compuestos de alta energía. Se forma la pared celular y se inicia la síntesis de ADN; con esto comienza nuevamente el crecimiento logarítmico.

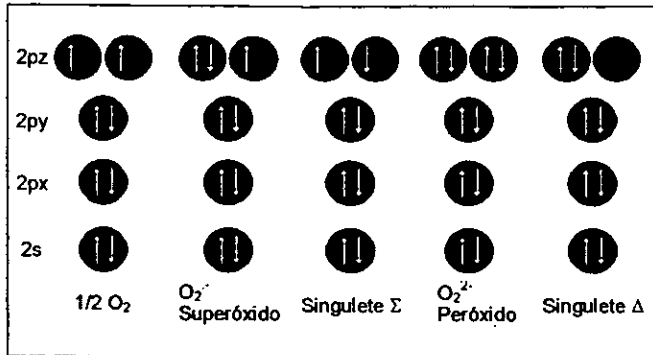
En *Bacillus* todo el proceso, desde la adición de los germinantes hasta la obtención de la célula vegetativa, puede tomar de 40 a 100 minutos, según el medio en que se germine (Setlow, 1981).

### 1.3. Especies de oxígeno reactivas en los sistemas biológicos

El dióxígeno ( $O_2$ ) es esencial para el mantenimiento de la vida en los organismos aerobios y microaerofílicos; sin embargo, para las células el oxígeno en altas concentraciones puede ser altamente tóxico debido a su capacidad de producir especies reactivas como el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singulete y los radicales superóxido e hidroxilo.

La molécula de oxígeno puede ser considerada como un birradical debido a los dos electrones que se encuentran desapareados en sus últimos orbitales (Figura 1.3) (Haliwell y Gutteridge, 1989).

La disposición paralela que presentan los electrones confiere al oxígeno una baja habilidad por aceptar un par de electrones de otra molécula en la que éstos se encuentren antiparalelos. Así la reducción del dióxígeno se retarda por la aceptación de electrones de uno en uno y genera especies reactivas de oxígeno (EROS).



**Figura. 1.3** Configuración electrónica de las especies reactivas generadas a partir de la molécula de dióxigeno (Haliwell y Gutteridge, 1989).

El oxígeno puede aumentar su reactividad si uno de los electrones solitarios absorbe energía e invierte su rotación generando una especie conocida como singulete (Fig 1.3).

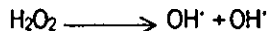
Existen dos tipos de oxígeno singulete, el sigma ( $\Sigma$ ) que tiene dos electrones desapareados debido a lo cual es un radical libre a diferencia del delta ( $\Delta$ ) que tiene todos sus electrones formando pares y no es un radical. El singulete sigma presenta una vida media muy corta y al ceder o aceptar electrones pasa a la forma delta, debido a esto la especie  $\Delta$  juega un papel importante en los organismos (Haliwell y Gutteridge, 1989).

El radical superóxido ( $O_2^-$ ) no es muy reactivo; sin embargo, es potencialmente dañino debido a la capacidad que tiene indirectamente de originar especies como el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ). El  $O_2^-$  al ser dismutado produce  $H_2O_2$  y este último puede generar  $HO\cdot$  (Fig. 1.4).

El  $H_2O_2$  no es un radical libre, sin embargo, es una especie reactiva con una capacidad oxidante débil. Difunde a través de las membranas con facilidad y tiene la capacidad de reaccionar con metales como el  $Fe^{2+}$  y el  $Cu^+$  para formar radicales hidroxilo de acuerdo a la siguiente reacción, descrita por Fenton en 1894:



El peróxido de hidrógeno también puede generar radicales hidroxilo al sufrir fisión homolítica por acción de algunos tipos de energía como radiaciones ionizantes o calóricas.



### 1.3.1 Producción de las EROS en los sistemas biológicos

Las EROS son producidas durante el metabolismo celular. En la formación del oxígeno singulete en los sistemas vivos participan pigmentos como rodopsina, clorofila a y b, riboflavina y sus derivados flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenin dinucleótido (FAD), bilirubina y porfirinas. Estas moléculas son capaces de absorber luz de cierta longitud de onda que provoca la excitación de sus electrones periféricos; esta energía puede ser transmitida a moléculas de dióxigeno vecinas para originar un oxígeno singulete.

La fuente más importante de producción de radicales libres en las células aerobias es la cadena de transporte de electrones, a través de ella se transportan cuatro electrones al complejo oxidasa terminal para reducir una molécula de dióxigeno a dos de agua.

Cuando se da una reducción incompleta del oxígeno molecular se pueden generar fácilmente en esta vía intermediarios como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilos.

Durante el transporte de electrones en algunos elementos de la cadena, principalmente en los complejos dinucleótido de adenina y nicotinamina reducido (NADH) coenzima Q reductasa y en las dos formas reducidas de la coenzima Q, se produce una fuga de electrones (autoxidación de semiquinonas), que reducen al dióxigeno y originan al superóxido.

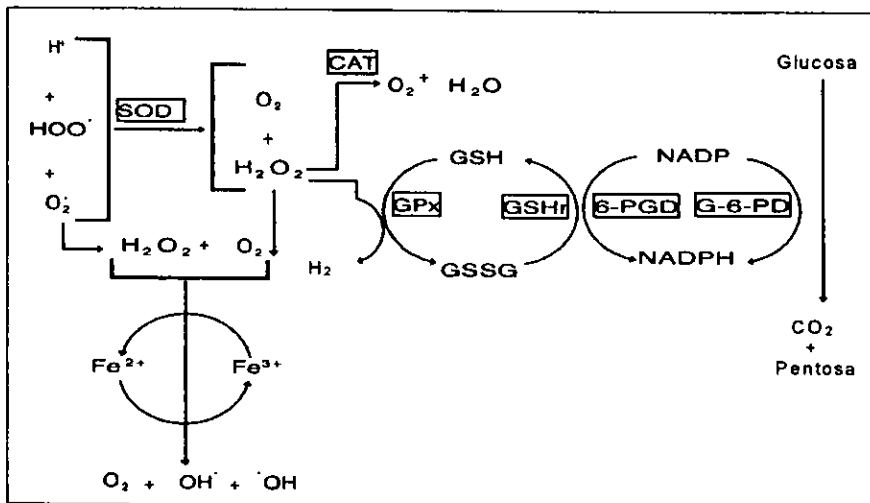
El radical superóxido también se forma, en cantidades pequeñas, cuando las moléculas de citocromo *o* se unen a una molécula de oxígeno y lo reducen (Poole, 1983).

Se estima que aproximadamente el 0.1% del oxígeno que consume *E. coli* es reducido a superóxido y en las mitocondrias, sólo una pequeña fracción del oxígeno total se convierte en este intermediario reactivo (Fridovich, 1998).

Además de la cadena respiratoria, existen otros mecanismos metabólicos generadores de radicales libres; en ellos actúan enzimas que degradan el radical superóxido y producen  $H_2O_2$  y  $O_2$  (Fig 1.4).

La fuente principal de producción del  $H_2O_2$  es la dismutación del radical superóxido, reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), presente en organismos procariontes y eucariontes.

El  $H_2O_2$  también se forma por acción de enzimas como la glicolato oxidasa, D-L amino oxidasa y urato oxidasa, durante la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadenas largas, en la síntesis de colesterol y de las purinas; en el catabolismo de los aminoácidos, el metabolismo del glicolato y por acción metabólica de las células del sistema inmune en las células eucariontes.



**Figura. 1.4** Esquema de las vías principales del metabolismo de radicales libres en los sistemas biológicos. CAT- catalasa, GSH- glutatión reducido, GSSG- glutatión oxidado, NADPH- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, NADP- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado, 6PDG- glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, SOD- superóxido dismutasa (Callahan, y col. 1988).

### 1.3.2 Mecanismos de transformación de las EROS en los sistemas biológicos

Las células presentan mecanismos que les permiten contrarrestar los daños producidos por las EROS. Los principales mecanismos de defensa antioxidante son:

- 1) Barreras fisiológicas que impiden el paso del oxígeno ambiental al interior celular.
- 2) Defensas antioxidantes no enzimáticas como las vitaminas E ( $\alpha$  y  $\beta$  tocoferoles), vitamina C (ácido ascórbico), los carotenos, el glutatión y el ácido úrico, entre otros.

- 3) Defensas antioxidantes enzimáticas. Compuesta por las catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasa (SOD). Las enzimas dependientes de glutatión (peroxidasas y transferasas), que actúan destruyendo a los radicales libres antes de que ataquen a las moléculas blanco (Halliwell y Gutteridge, 1989).

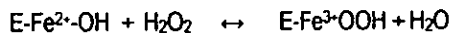
Newton y Fahey en 1990 reportaron en *B. cereus* la presencia de glutatión como sistema de defensa no enzimática y en nuestro laboratorio existen trabajos preliminares realizados por Shaday y Layla Michán Aguirre en los que se reporta la presencia de catalasas y SOD como sistemas antioxidantes de tipo enzimático.

#### 1.4. Mecanismos enzimáticos antioxidantes: las catalasas

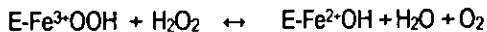
Se han identificado dos clases de hemoproteínas llamadas hidropoxidasas que están involucradas en el metabolismo del peróxido de hidrógeno: las catalasas y las peroxidasas; de esta manera, las células moderan o previenen parte del daño oxidativo.

Las catalasas son hemoproteínas que convierten el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno mediante una reacción de dos pasos:

En el primero, una molécula de  $H_2O_2$  se convierte a agua mientras que el hemo se oxida formando un intermediario llamado compuesto I.



Posteriormente, una segunda molécula de peróxido dona sus electrones y un oxígeno al compuesto I, resultando en la formación de oxígeno molecular y la enzima queda en estado libre (Hillar y col., 1999).



Las peroxidasas siguen una reacción similar excepto que el reductante del compuesto I es usualmente un donador de electrones orgánico.

Las catalasas se han aislado comúnmente de animales, plantas y microorganismos, dentro de este grupo encontramos a dos tipos de enzimas: las catalasas típicas y las catalasas-peroxidasas (Hochman y col., 1992).

Dentro de las características principales de las catalasas típicas tenemos que: son hemoproteínas homotetraméricas con un peso molecular entre 225 a 270 KDa, su actividad catalítica es independiente del pH presentando una meseta de actividad entre pH 5 y 10.5. Son estables en una mezcla de etanol/cloroformo y se inhiben específicamente por el 3-aminotriazol (Golberg y Hochman, 1989).

Las catalasas-peroxidasas difieren de las catalasas típicas en que tienen las dos actividades, de catalasa y de peroxidasa, pueden usar diversos donadores de electrones auxiliares para reducir el peróxido en agua, son insensibles al 3-aminotriazol, son inactivadas por cloroformo/etanol y son sensibles a la temperatura. Se inhiben, igual que las catalasas típicas, por azida y cianuro (Levy y col. 1992).

Las peroxidasas son capaces de oxidar una gran variedad de sustratos en presencia del peróxido de hidrógeno. Su actividad se ha detectado en extractos celulares con sustratos artificiales como el guaiacol, la bencidina, el pirogalol y la o-dianisidina; sin embargo, no se ha identificado el sustrato natural de estas peroxidasas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

### 1.4.1 Catalasas en las bacterias

Las catalasas-peroxidasas han sido purificadas de distintas bacterias, son proteínas multiméricas de ~80 kDa cada subunidad; la catalasa HPI de *E. coli* y la catalasa-peroxidasa de *Rhodospseudomonas capsulata* son tetraméricas. Las peroxidasas de *B. stearothermophilus* y *Comamonas compransoris*, son diméricas y la peroxidasa de *Halobacterium halobium* es monomérica (Gjesing, 1991).

Algunas de estas catalasas-peroxidasas son transcripcionalmente inducidas por el regulón oxy R como parte de la respuesta genética al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por ejemplo: la HPI de *E. coli*, y la de *Synechococcus* PCC794; mientras que otras aumentan su actividad al entrar a la fase estacionaria como la de *Caulobacter crescentus* (Matsuda y col., 1996) (Schenell y Steinman, 1995).

La función que se le da a estas catalasas-peroxidasas es la de atrapar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por el estrés oxidativo y por otros tipos de estrés como el calórico y la limitación de nutrientes, sin embargo, como esta enzima es muy lábil ya que se inactiva por peróxido y bajas temperaturas, no podría usarse en condiciones de estrés. Por ello se sugiere que la enzima funciona principalmente como peroxidasa acoplada a la oxidación de algunos sustratos importantes como el NADH o NADPH (Matsuda y col., 1996). El análisis de las respuestas al estrés en bacterias ha revelado que existe una red de sistemas regulatorios interconectados. Cada tipo de estrés induce un grupo característico de proteínas (entre las que se encuentran las catalasas) que se sobrelapan con otras proteínas de estrés. Por ejemplo, en *B. subtilis* algunas proteínas son inducidas por diversas circunstancias: el calor, el etanol, el peróxido de hidrógeno, altas concentraciones de sal, carencia de fuentes de carbono o nitrógeno y la limitación de oxígeno. Esto ha llevado a sugerir que estas proteínas de estrés pueden conferir a la célula una protección general que se presenta bajo condiciones adversas (Völker y col., 1992).

La catalasa-peroxidasa de *Vitreoscilla* sp, una bacteria aerobia, tiene como función principal el descomponer el peróxido de hidrógeno generado por la hemoglobina presente en esta bacteria (Vithb) que se expresa en condiciones de hipoxia. La Vithb se autooxida más que las hemoglobinas eucarióticas y los productos de esta autooxidación son la VitmetHb y peróxido de hidrógeno (Abrams, y Webster, 1990).

En *Klebsiella pneumoniae*, la catalasa-peroxidasa funciona como atrapador del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> especialmente a bajas concentraciones usando su actividad peroxidativa ya que su K<sub>M</sub> es de 0.65 mM, también funciona en algunas vías del metabolismo degradativo o biosintético de la lingulina y regula el potencial redox de la célula porque puede oxidar nucleótidos de piridina (Goldberg y Hochman, 1989).

En *E. coli*, la HPI tiene como función principal descomponer los peróxidos formados a nivel de la membrana, ya que se encuentra localizada en el periplasto de la membrana externa. Tiene un papel antioxidante durante la fase logarítmica y puede oxidar compuestos como el NADH y NADPH. Presenta un pH óptimo de 7.5 para su actividad de catalasa (Heimberg y Eisenstark, 1988) (Loewen y col. 1985) (Spencer y col. 1988).

También se ha visto que en algunas especies bacterianas infecciosas, como las pertenecientes al género *Mycobacterium*, la catalasa-peroxidasa tiene un papel muy importante en el metabolismo de la bacteria, incrementando de manera significativa la sobrevivencia de este parásito dentro del macrófago (Menéndez y col. 1997).

### 1.4.2 Catalasas en el género *Bacillus*

En *Bacillus subtilis* se ha observado la presencia de dos catalasas que fueron purificadas y caracterizadas bioquímicamente: la Cat-1 (codificada por el gen kat A) está presente durante la fase del crecimiento exponencial y se sobreexpresa al final de la etapa logarítmica, esta enzima

se encuentra en el citoplasma celular (Loewen y Switala, 1987<sup>1</sup>, 1987<sup>2</sup>, 1988). Un reporte adicional, menciona que esta enzima puede ser secretada al medio durante la fase estacionaria y la consideran una enzima extracelular (Nacleiro y col., 1995).

La Cat-2 (gen kat E) se induce durante el inicio de la esporulación, en la etapa estacionaria. Loewen y Switala en 1987 reportaron que las esporas maduras sólo presentan esta isoenzima y que algunas cepas mutantes que no pueden esporular no la presentan.

Sin embargo, sobre este aspecto en particular, existe un reporte que menciona la existencia de una catalasa específica de las esporas de *B. subtilis*. Esta catalasa denominada cat-X está codificada por el gen x (kat-x) el cual se encuentra bajo el control específico del factor  $\sigma^F$  que se sintetiza en un nivel significativo durante la esporulación (Bagyan y col., 1998).

En el género *Bacillus*, sólo existen dos reportes de la presencia de alguna catalasa-peroxidasa: en *B. stearothermophilus* se ha aislado y caracterizado a esta enzima, es un dímero con dos grupos protohemo IX (uno por molécula). Tiene una temperatura óptima de 70°C, se ha identificado su secuencia de aminoácidos y presenta un 48% de homología con la HPI de *E. coli* (Loprasert, et al., 1989).

La catalasa-peroxidasa del *Bacillus alcalofilo* YN-2000 presenta una actividad peroxidativa con guaiacol. El pH óptimo de la actividad de catalasa es de 6, mientras que el de su actividad peroxidativa es de 9. La composición de aminoácidos de esta enzima es similar a la de la peroxidasa de *Halobacterium halobium* y a la catalasa de *Neurospora crassa*. (Yumoto, et al., 1990).

Los trabajos preliminares desarrollados en nuestro laboratorio por Layla y Shaday Michán Aguirre con *Bacillus cereus*, sugirieron la presencia de dos catalasas, la catalasa vegetativa (VEG) que está presente durante el crecimiento exponencial y la catalasa SPO, exclusiva de la espora. En las esporas se encuentra tanto la catalasa VEG como la SPO, la primera asociada al exosporio y la segunda en el protoplasma.

Sabemos que el integumento (exosporio) de la espora posee elevadas cantidades de una catalasa que por su movilidad electroforética se parece a la cat-VEG y que la enzima cat-SPO es la única especie de catalasa que se puede detectar en el citoplasma de la espora madura. A pesar de estar presente en cantidades muy limitadas, parecería ser que su función sería eliminar el peróxido de hidrógeno formado durante la germinación y luego durante el crecimiento sería sustituida por la cat-VEG.

### 1.5. Estrés oxidativo y diferenciación celular

La "Teoría de evasión del dioxígeno" desarrollada por Hansberg y Aguirre en 1990 propone una explicación al fenómeno de la diferenciación celular en microorganismos.

Esta teoría sostiene que las condiciones de tensión metabólica propician la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno, que al producirse por arriba de la capacidad antioxidante de la célula, generan un estado inestable o también llamado hiperoxidante.

Para compensar este estado, la célula debe aumentar su capacidad para reducir al dioxígeno, o bien disminuir la entrada del mismo; en el primer caso la célula regresa a su estado estable anterior logrando adaptarse a condiciones más oxidantes. Si reacciona evadiendo de manera rápida el dioxígeno, la célula alcanza un estado estable diferente producto del cambio en su organización morfológica y funcional; pero si no puede compensar rápidamente el estado hiperoxidante, la célula muere.

Uno de los hechos en los que se apoya la teoría es que durante el proceso de conidiación de *Neurospora crassa* existe un estado hiperoxidante relacionado con el proceso morfogénico. Se ha observado la pérdida del poder reductor celular, la emisión de luz relacionada a la generación de algunas especies reactivas de oxígeno y diversos cambios en los mecanismos antioxidantes de las células (Hansberg y Aguirre, 1990)

Se ha identificado también que algunas bacterias presentan sistemas adaptativos para contrarrestar los cambios drásticos producidos en el ambiente, por ejemplo: cuando se da un estrés oxidativo, se induce la expresión de algunos genes de enzimas específicas y se encienden los mecanismos de reparación del ADN (Dowds, 1994).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Identificar y distinguir las isoenzimas de catalasa durante los diferentes estados de desarrollo de *Bacillus cereus*, analizar sus propiedades catalíticas y determinar su relación con la diferenciación celular.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a las catalasas en cuanto a su localización y expresión dentro de las esporas de *B. cereus*.
- Determinar las características bioquímicas de las isoenzimas de catalasa presentes en el ciclo de vida de *B. cereus*.
- Conocer el patrón de expresión de la catalasa en el compartimento inmaduro de la esporosa y durante las fases de maduración (estados III a VII).
- Comparar la catalasa(s) de la espora con la catalasa de la fase vegetativa.

## HIPOTESIS

Si relacionamos la diferenciación celular con el estrés oxidativo, podemos plantear que la falta de nutrientes en el medio genera una tensión oxidativa que probablemente influye en el proceso de esporulación y en la inducción de algunas enzimas antioxidantes.

Sabemos que la actividad de catalasa se modifica a lo largo del ciclo de vida bacteriano para así contrarrestar estas condiciones de tensión oxidativa imperantes dentro de la célula.

Dado que el esporangio de *Bacillus cereus* está formado por dos compartimentos (la célula madre y la endospora), es posible que la expresión de las catalasas durante la esporulación ocurra de manera diferencial, durante la etapa específica y asociada a cada compartimento.

Suponemos que las catalasas presentes en las esporas de *B. cereus* tienen características diferentes y que la isoenzima presente en el protoplasto de la espora (denominada spo-prot), tiene un papel específico durante el proceso de germinación de la espora, mientras que la isoenzima del tegumento (spo-teg) estaría asociada al crecimiento vegetativo y a la esporulación temprana.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Material químico

Todos los reactivos utilizados para llevar a cabo los experimentos tuvieron un grado de pureza de reactivo analítico para investigación y de las marcas más prestigiadas del mercado.

#### 3.2 Material Biológico

Se trabajó con la cepa silvestre de *Bacillus cereus*, la cual fue aislada y caracterizada por Andreoli y col. en 1973.

##### 3.2.1 Obtención de células en los medios de cultivo

*B. cereus* creció en el medio G2x para obtener células en etapa vegetativa y durante el proceso de esporulación y en un medio mínimo con el fin de observar la germinación y recuperar las células primarias.

El medio G2x es un medio fermentable con el doble de la cantidad de sacarosa, extracto de levadura y de los fosfatos para obtener una mayor masa celular. Los componentes del medio G doble fueron:

- Extracto de levadura 0.2%
- Sacarosa 0.2%
- Sulfato de amonio 0.2%
- Fosfato dibásico de potasio 0.1%
- 1% de cada una de las siguientes sales (Hanson y col., 1963):

MgSO<sub>4</sub>

CuSO<sub>4</sub>

CaCl<sub>2</sub>

MnSO<sub>4</sub>

ZnSO<sub>4</sub>

CoSO<sub>4</sub>

Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>

El medio mínimo para germinación se preparó con:

- Amortiguador de fosfato de potasio 25 mM a pH 7.4
- Sales del medio G

Los cultivos se realizaron en un fermentador New Brunswick modelo Bioflow 5000 con capacidad de 60 litros de medio bajo condiciones aerobias (60 l de aire min<sup>-1</sup>), a una temperatura de 30°C y agitación constante de 200 rpm. El fermentador se inoculó con cultivos sincrónicos en estado logarítmico, con un volumen equivalente al 5% del volumen total del fermentador.

Durante el cultivo se siguió la densidad óptica a 540 nm, el pH del medio y se observaron las células al microscopio óptico para cosecharlas en etapa vegetativa y durante las diferentes fases de la esporulación. El comienzo de la esporulación (T<sub>0</sub>) se consideró a los 30 minutos después de que el cultivo alcanzó su pH mínimo. A partir de ahí se cosecharon 5 litros de muestra de cada una de las etapas de la esporulación, de acuerdo a sus características morfológicas con una hora de diferencia entre cada una (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub>). Para obtener esporas libres el cultivo se cosechó después de 24 horas (ver figura 1.1).

Los cultivos se cosecharon en una centrifuga de flujo continuo (Sharples TI). La masa celular obtenida se resuspendió en amortiguador de fosfatos 50 mM. MgCl<sub>2</sub> 3 mM, pH 7.4 y las esporas se lavaron tres veces con agua destilada para evitar su germinación; las células se centrifugaron a 8600 x g durante 10 minutos en una centrifuga Beckman JA-21 y todas las manipulaciones se llevaron a cabo a 4°C. Posteriormente los paquetes celulares se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### 3.2.2. Obtención de esporas sin tegumento

Las esporas de *B. cereus* se resuspendieron en una solución de Tritón X-100 al 2% y se agitaron durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 7740 xg durante 15 minutos en la centrifuga Beckman, se recuperó el sobrenadante que contiene la fracción del tegumento y las esporas "rasuradas" se recuperaron después de lavarlas en tres ocasiones con agua destilada centrifugando a la misma velocidad para romperlas posteriormente en la licuadora Bead-Beater.

El extracto del tegumento obtenido, se agitó durante 9 horas a 4°C, en presencia de perlas Bio-Beads SM-2 para quitar la mayor cantidad de detergente posible y poder realizar todos los ensayos posteriormente (ver fig. 3.1)

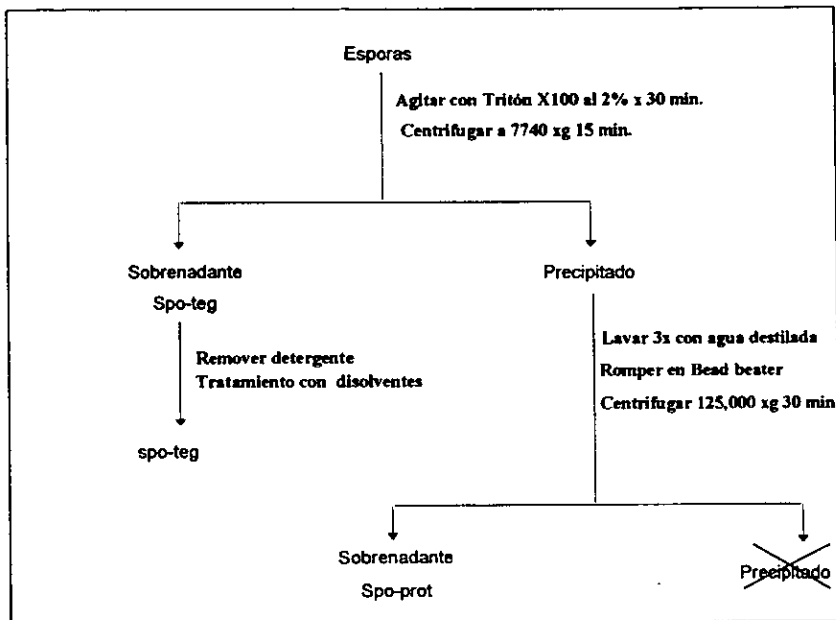
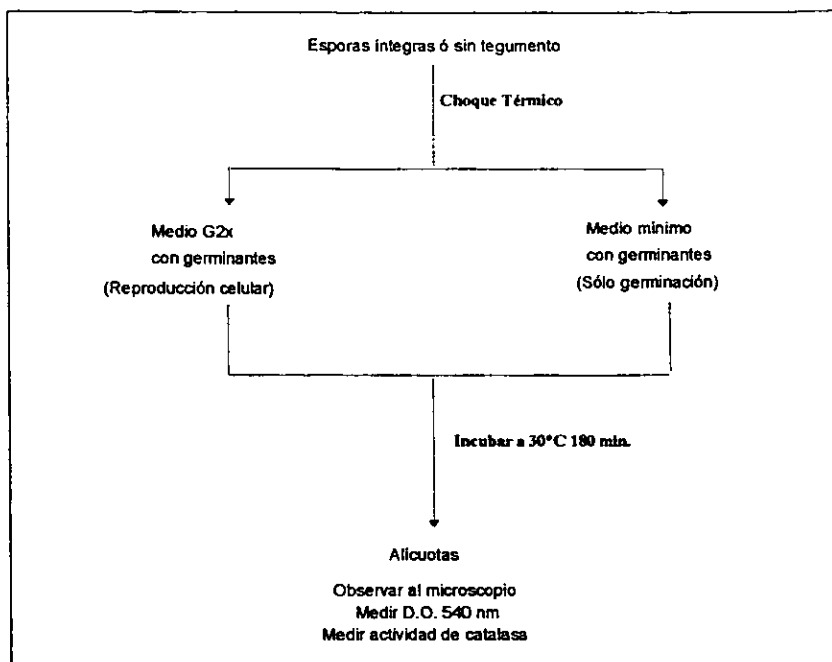


Figura 3.1. Obtención de las fracciones del tegumento y el protoplasto de la espora de *B. cereus*.

### 3.2.3 Obtención de células primarias

Para conocer el papel de las catalasas durante la germinación y el crecimiento logarítmico, se comparó el comportamiento de las esporas integra y "rasuradas" con tritón (sin tegumento), incubando a los dos tipos de esporas en una mezcla de sales del medio G (en donde sólo ocurre la germinación) y en el medio normal G2x, donde hay reproducción celular (Fig. 3.2).

Se colocaron 40 mg (peso seco) de esporas en 10 ml de amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7.4, se sometieron a choque térmico y posteriormente se les agregó la misma cantidad de medio mínimo o medio G2x (según sea el caso) para incubarlo a 30°C durante 180 minutos. En ese momento a ambos medios se les agregó como germinantes: alanina 40 mM y adenosina 2 mM.



**Figura 3.2.** Método de obtención de células primarias y células vegetativas a partir de los dos diferentes tipos de esporas.

Se tomaron muestras a diferentes tiempos a las que se les determinó la densidad óptica a 540 nm, se observaron al microscopio óptico para calcular el porcentaje de germinación y se les midió la actividad de catalasa en el oxímetro.

### 3.3 Ruptura de las células

Las células obtenidas en cada una de las diferentes etapas se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 50 mM y  $MgCl_2$  3 mM a pH 7.4, en presencia de 1 mM de PMSF y de una tableta coctel Complete (inhibidores de proteasas).

Las células se rompieron con ayuda de perlas de vidrio con diámetro de 150-212  $\mu m$  en el fraccionador Bead Beater, dando pulsos de 30 segundos de ruptura con intervalos de 5 min de descanso en baño de hielo para evitar el calentamiento, hasta acumular 12 pulsos. La ruptura celular se comprobó por microscopía.

Posteriormente, se filtró la suspensión para eliminar las perlas de vidrio y se centrifugó a 125,000 xg durante 40 minutos en una ultracentrífuga Beckman L-60. El precipitado se desechó y se recuperó por decantación el sobrenadante libre de membranas en el cual se midió la actividad de catalasa.

### 3.4 Obtención de fracciones semipuras de las diferentes catalasas de las esporas

#### 3.4.1 Extracción de la catalasa del tegumento (spo-teg)

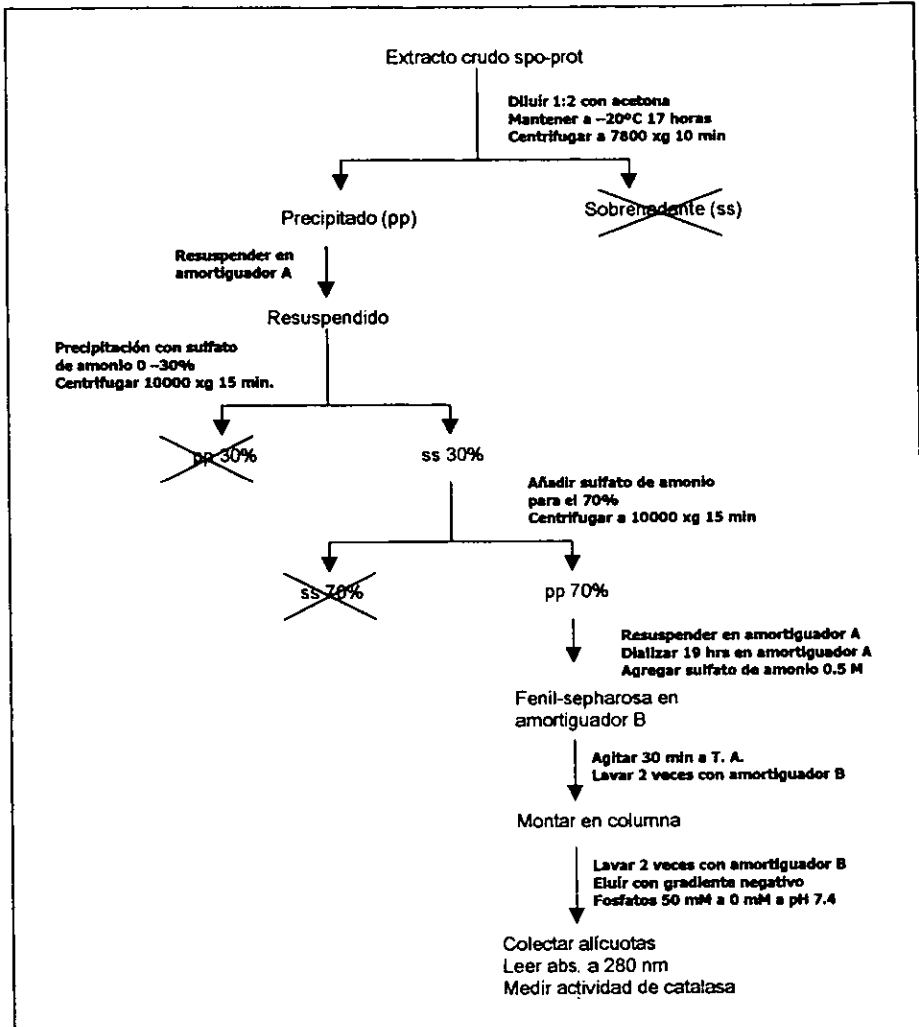
El extracto del tegumento sin detergente se trató con cloroformo y etanol en una relación 10:5:3 v/v respectivamente. Esta mezcla se agitó en el vórtex por 10 minutos y se centrifugó después a 10 000 xg durante 5 min. Se separó la fase líquida superior (que es la que contiene la

actividad de catalasa) y se dializó por aproximadamente 10 horas contra amortiguador de fosfato de sodio 50 mM EDTA 10 mM pH 7 a 4°C (Nadler, y col., 1986).

Esta fracción se separó en alícuotas y se mantuvo en congelación hasta su uso (Fig 3.1).

### 3.4.2 Purificación parcial de la catalasa del protoplasto de la espora (spo-prot)

El extracto crudo obtenido de la ruptura de las esporas rasuradas se diluyó 1:2 con acetona y se mantuvo a -20°C durante 17 horas.



**Figura 3.3.** Método de purificación parcial de la catalasa del protoplasto de la espora (spo-prot). Amortiguador A: Fosfato de potasio 50 mM pH 7.4. Amortiguador B: Fosfato de potasio 50 mM, sulfato de amonio 0.5 M pH 7.4.; T.A.= temperatura ambiente

Esta mezcla se centrifugó a 7800 xg durante 10 min; el sobrenadante obtenido se desechó y el precipitado se resuspendió en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM a pH 7.4 para precipitarlo después con sulfato de amonio de 0 a 30% centrifugando a 10 000 xg por 15 minutos.

El precipitado obtenido se resuspendió en amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.4 y al sobrenadante con 30% se le agregó el sulfato de amonio necesario para llegar a una concentración final de 70%, el cual se centrifugó a la misma velocidad para obtener un precipitado del 70% que se resuspendió en el mismo amortiguador y el sobrenadante de 70%. Estas tres fracciones (pp 30%, pp 70% y ss 70%) se dializaron durante 19 hrs aproximadamente contra amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.4 y se les midió después actividad de catalasa y cantidad de proteína (Fig. 3.3).

El pp del 70% se adsorbió agitando con la resina fenil-sepharosa equilibrada con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7 con sulfato de amonio 500 mM, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se dejó precipitar y se lavó con 2 volúmenes del mismo amortiguador agitando 30 minutos; se montó después la resina en la columna, lavando nuevamente con el mismo amortiguador. Posteriormente, la columna se eluyó con un gradiente negativo (sin sulfato de amonio) de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7 a 0 mM de fosfatos; se colectaron alícuotas de 1 ml aproximadamente, las cuales se mantuvieron a 4°C para determinarlas la absorbencia a 280 nm y la actividad de catalasa. Se agruparon las fracciones que presentaban actividad de catalasa para realizar posteriormente las pruebas bioquímicas (Fig 3.3).

### 3.5. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína de las muestras se llevó a cabo por el método originalmente descrito por Lowry (1951) y modificado por Markwell (1981), el cual tiene una sensibilidad de detección de 0.005 a 0.02 mg de proteína.

La técnica consistió en hacer una curva patrón poniendo 0, 5, 10, 15, 20 y 30  $\mu$ l de una solución estándar de albúmina bovina a una concentración de 1 mg por ml. En otros tubos se colocaron concentraciones crecientes de la muestra problema. En ambos casos se aforó a 50  $\mu$ l con agua destilada. Después de completar la curva patrón y los problemas, se adicionó 1 ml de la siguiente mezcla:

1 ml de  $\text{CuSO}_4$  al 2%

1 ml de tartrato de sodio y potasio al 2%

23 ml de NaOH 0.1 N conteniendo  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%

Los tubos se agitaron perfectamente en el vórtex y se dejaron reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se les agregó 50  $\mu$ l de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido con agua destilada 2:1 (1 ml de Folin + 0.5 ml de agua) agitando inmediatamente en el vórtex y después de 10 minutos de reposo, se tomó la lectura a 750 nm. Como referencia, se calibró el espectrofotómetro con el tubo de la curva patrón que no contenía albúmina.

Los datos de la curva patrón se graficaron por regresión lineal con el método de mínimos cuadrados y se calculó la concentración de proteína en las muestras problema.

### 3.6. Determinación de la actividad específica y total de catalasa (Método polarográfico)

El método usado para conocer la actividad de catalasa fue el descrito por Goldstein (1968); consistió en determinar la velocidad de producción de oxígeno molecular a partir del peróxido de hidrógeno. La medición se hizo utilizando un oxímetro Yellow Springs Instruments Modelo 57 y un electrodo de Clark sensible al oxígeno producido en una cámara de reacción de 1.8 ml de capacidad, termostregulada a 30°C.

Los ensayos se llevaron a cabo adicionando a la cámara de reacción lo siguiente:

- 1) 1.8 ml de amortiguador de fosfato dibásico de potasio 0.1 M pH 7.4 previamente burbujeado con nitrógeno gaseoso con el fin de disminuir la cantidad de oxígeno presente en la cámara.
- 2) Un volumen de muestra ( 25, 50 o 100  $\mu$ l, según sea el caso).
- 3) 100  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% diluido 1:1 con agua destilada (v/v).

La actividad específica de catalasa se reportó como la cantidad de nanoátomos de oxígeno producidos en un minuto por miligramo de proteína (nat O/min/mg). Para obtener la actividad total, se multiplicó la actividad específica por el total de miligramos de proteína de la muestra.

Los ensayos para determinar la  $K_M$  de las catalasas se realizaron en el oxímetro en el mismo amortiguador agregando el peróxido de hidrógeno en concentraciones crecientes, de 1.5 mM a 120 mM. Los datos obtenidos se procesaron por los programas Enz-Fiter y Microcal Origin para calcular los datos de  $K_M$  y  $V_{max}$  de cada enzima.

### 3.7. Inhibición con azida de sodio, cianuro de potasio y 3, amino1,2,4 triazol

Para conocer la sensibilidad de las catalasas al cianuro de potasio y a la azida de sodio, se realizaron los ensayos en amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M a pH 7.4 incubando la muestra en la cámara del oxímetro durante un minuto con concentraciones crecientes de cada inhibidor y agregando después el sustrato a una concentración de 100 mM. (Loewen y Switala, 1987, 1988).

La inhibición de la actividad de catalasa por aminotriazol se realizó incubando un volumen de muestra en amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.4 en presencia de peróxido de hidrógeno 4 mM, ascorbato de sodio 4 mM y aminotriazol 5 mM a 37°C durante una hora, se fueron tomando alícuotas de 300  $\mu$ l cada 5 minutos y se les midió actividad de catalasa en el oxímetro por triplicado (Margoliash, y col., 1960). Para ver más claramente la acción del inhibidor en las catalasas, también se realizaron ensayos de tipo dosis-respuesta con concentraciones crecientes del aminotriazol.

### 3.8 Efecto del pH sobre la actividad de catalasa

Los experimentos se llevaron a cabo en un amortiguador de MES 100 mM, Tris 51 mM y etanolamina 51 mM (amortiguador que mantiene la fuerza iónica constante), ajustando a valores de pH de 4 a 11 con ácido clorhídrico y con hidróxido de amonio concentrados. Un volumen de cada muestra de catalasa se incubó en dicha mezcla durante un minuto y después se le agregó el peróxido de hidrógeno (Ellis, y Morrison, 1995).

### 3.9 Determinación de la actividad de peroxidasa con varios sustratos

La actividad de peroxidasa se midió espectrofotométricamente a temperatura ambiente siguiendo la tasa de oxidación de los sustratos; los ensayos se realizaron en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.4, peróxido de hidrógeno 20 mM, en presencia de un donador de electrones y la cantidad apropiada de muestra. Los donadores utilizados fueron: ascorbato 0.6 mM ( $E_{290} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), o-dianisidina 0.3 mg/ml ( $E_{460} = 11.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), NADPH 0.2 mM ( $E_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), guaiacol 30 mM ( $E_{470} = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y pirogalol 20 mM ( $E_{430} = 2.47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) sólo para este último ensayo se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  a una concentración de 740  $\mu$ M (Goldberg y Hochman, 1989).

Las lecturas se hicieron cada 3 segundos durante un minuto en un espectrofotómetro Beckman DU 640 y la actividad de peroxidasa se cuantificó con base al coeficiente de extinción molar de cada sustrato.

### 3.10 Electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se hicieron de acuerdo con el método descrito por Davis (1964) y modificado por Hedrick y Smith (1968), en una cámara de electroforesis marca Bio-Rad modelo Miniprotein II con placas de vidrio de 8 cm de ancho por 7 de alto con separadores y peine de 0.5 mm de grosor.

El gel resolvidor tuvo una concentración de acrilamida de 7.5% y para el gel concentrador de 4.5%. Los geles se prepararon a partir de una solución de acrilamida del 30% y 0.8% de

bisacrilamida. Los amortiguadores de los geles fueron de Tris-HCl; la concentración final para el gel resolvidor fue de 0.375 M, pH 8.9 y para el concentrador fue de 0.125 M, pH 6.8. Para polimerizar la acrilamida se agregaron 63  $\mu$ l de una solución de sulfato de amonio al 10% preparada en fresco y 10  $\mu$ l de TEMED.

El amortiguador de la cámara fue Tris 0.025 M, glicina 0.192 M a un pH de 8.5. Las muestras se diluyeron 1:2 con la siguiente solución: Tris 100 mM a pH 6.8, glicerol 10% y 3  $\mu$ M de azul de bromofenol.

La electroforesis se realizó a una corriente constante de 1 mA por cm de gel en el concentrador y de 1.5 mA por cm de gel en el resolvidor. El tiempo total de corrida fue alrededor de 2 horas.

En los geles se corrieron muestras por triplicado, dos se revelaron para observar las actividades de catalasa y de peroxidasa (por zimograma), y la última se utilizó para tefir las proteínas agitando el gel durante 30 minutos en la solución de tinción que contenía: glicerol 5%, ac. acético 10%, metanol 25% y azul de Coomassie R-250 al 1%. Posteriormente los geles se destiñeron con una solución de metanol 25%, glicerol 5% y ácido acético 10%.

### 3.10.1 Isoelectroenfoque

Para la determinación del punto isoeléctrico de las diferentes catalasas, se preparó un gel de poli(acrilamida) al 5.5% conteniendo 2.2% de anfolitas a pH 3-10 y 20% de glicerol de 1 mm de grosor. Para polimerizar el gel se utilizaron 46  $\mu$ l de solución de persulfato al 10% y 21  $\mu$ l de TEMED.

La solución del cátodo fue NaOH 100 mM y la del ánodo fue de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM; el gel se precorrió durante 20 minutos a 250 volts. Posteriormente, se colocan las muestras en los pozos diluidas 1:1 (v/v) con la siguiente mezcla: glicerol 15% y anfolitas 2.4% y se corre el gel a 300 V durante 3.5 horas con soluciones de ánodo y cátodo nuevas.

A continuación se cortaron dos carriles en bandas de 0.5 cm de grosor y se colocaron en tubos Eppendorf con 1 ml de agua destilada para la medición posterior del pH de cada una de ellas; el resto del gel se reveló por zimograma para actividad de catalasa.

### 3.10.2 Determinación de catalasa y peroxidasa mediante zimogramas

Para ver la actividad de catalasa en los geles, se siguió la técnica descrita por Harris y Hopkinson (1976) y modificada por Chary y Natving (1989) que consiste en la aparición de bandas incoloras en un fondo azul obscuro, relacionadas con la actividad de catalasa.

El gel se agitó durante 5 minutos en una solución de metanol al 5% para fijar las proteínas; posteriormente, se enjuagó con agua destilada y se dejó incubando durante 5 minutos en una solución 0.03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a temperatura ambiente. Por otra parte, se preparó una solución de ferricianuro de potasio y otra de cloruro férrico, ambas al 2% justo antes de usarse.

Después se enjuagó el gel con agua destilada y se incubó en la mezcla de las dos soluciones anteriores. Los componentes de la mezcla se precipitan en presencia de peróxido de hidrógeno y tiñen el gel de azul. En las zonas donde no existe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, debido a la acción de la catalasa, no hay precipitación y quedan las bandas incoloras.

Para observar la actividad de peroxidasa se reveló el gel por la modificación del método de Gregory y Fridovich (1974), usando tetrametilbenzidina (0.3 mg/ml) disuelta en una solución de etanol, ácido acético y agua (1:1:1 v/v). Los geles se incubaron en esta mezcla durante 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente y después se transfirieron a una solución de peróxido de hidrógeno al 2% hasta que se evidenciaron las bandas azules de peroxidasa (Abrams y Webster, 1990).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Curva de crecimiento de *Bacillus cereus*

La gráfica 4.1 muestra la cinética de crecimiento de *B. cereus* en medio G2x. Las células se cosecharon a la mitad de la fase logarítmica (3.5 horas posteriores a la inoculación), células en T0, 30 minutos después de que el cultivo alcanzó su pH mínimo, que en este caso fue de 6.1; células en fase T1, T2, T3, T4, T5, T6 y esporas libres (24 horas después de haber inoculado el fermentador).

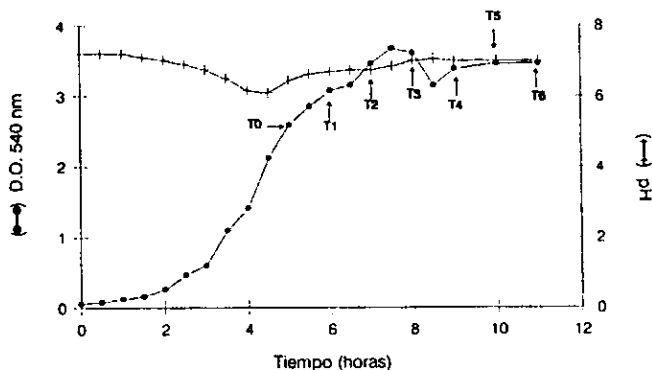


Figura 4.1. Cinética de crecimiento de *Bacillus cereus* en medio G2x.

### 4.2. Variaciones en la actividad de catalasa durante el crecimiento logarítmico y el proceso de esporulación en células enteras y extractos totales de *B. cereus*

Se midió actividad de catalasa a las células enteras en las diferentes fases del desarrollo de la bacteria. La actividad tiende a mantenerse constante desde la etapa logarítmica media hasta T3. Hay un aumento significativo de casi el doble en T4 el cual se incrementa aún más hasta llegar a su máximo en la etapa T6. Al finalizar el proceso de esporulación (en las esporas libres), la actividad de catalasa regresa a sus valores basales. Estos resultados se muestran en la figura 4.2.

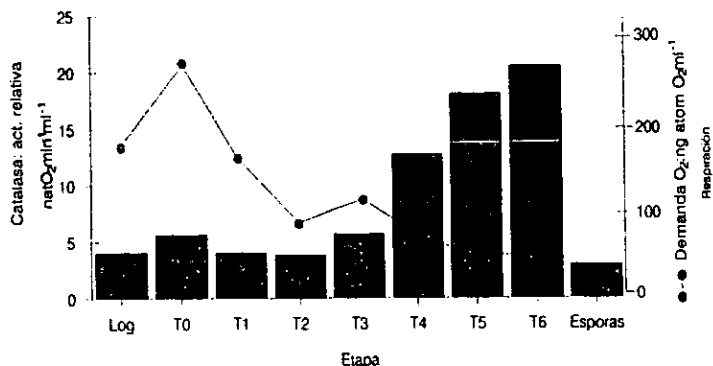
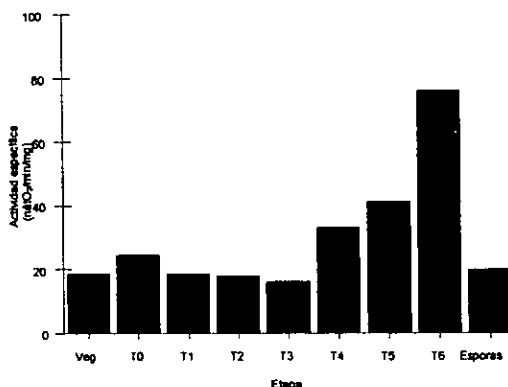


Figura 4.2. Actividad de catalasa en las células enteras de las diferentes etapas del ciclo de vida de *B. cereus*. La actividad relativa de la enzima se expresa como nátomos de O<sub>2</sub>/min.

El aumento en la actividad relativa de catalasa no está relacionado con un aumento en el metabolismo aerobio de la bacteria. Como puede observarse en la figura 4.2, la respiración aerobia va disminuyendo conforme avanza el desarrollo teniendo un mínimo en la etapa T6 que corresponde al máximo de actividad relativa de catalasa.



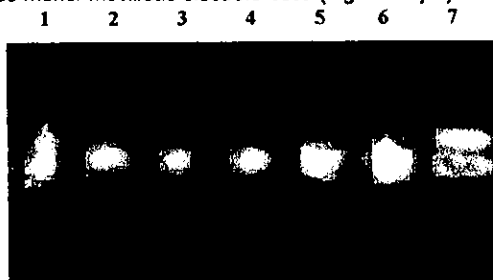
**Figura 4.3.** Actividad específica de catalasa en los extractos totales de las células en las etapas: logarítmica, durante el proceso de esporulación y en las esporas libres.

Los resultados anteriores se comprobaron al medir la actividad específica de catalasa en los extractos de las células en las mismas fases del desarrollo de la bacteria (Fig. 4.3).

Adicionalmente, se comprobó que ninguna catalasa se excreta al medio de cultivo en alguna de las fases de desarrollo estudiadas ya que no se encontró actividad en los sobrenadantes de las diferentes etapas del desarrollo de la bacteria.

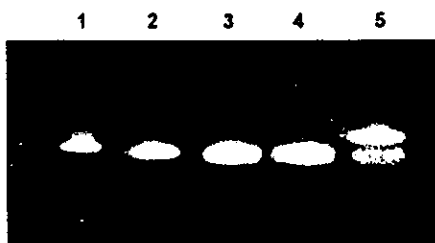
#### 4.3. Identificación de isoenzimas de catalasa

Los zimogramas que se realizaron para detectar la aparición de las isoenzimas de catalasa fueron cargados con diferentes concentraciones de proteína de cada muestra con el fin de lograr una mejor definición de las bandas de actividad. Estos geles revelaron una banda presente en las células de crecimiento logarítmico, T0 y que continúa hasta T6 (Figura 4.4a); sin embargo, en el extracto de las esporas maduras se observan dos bandas, una que coincide con la catalasa presente en la fase vegetativa y otra de menor movilidad electroforética (Fig. 4.4 a y b).



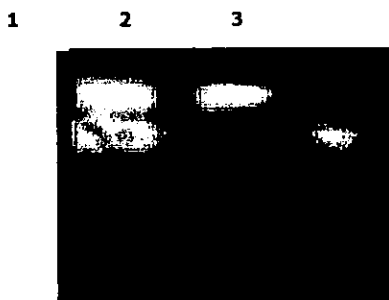
**Figura 4.4a** Zimograma de las catalasas presentes en las etapas del desarrollo de *B. cereus*. Carril 1: catalasa vegetativa (50 µg de proteína), carril 2: T0 (13 µg), carril 3: T3 (6.25 µg), carril 4: T4 (5 µg), carril 5: T5 (4 µg), carril 6: T6 (5 µg), carril 7: esporas (50 µg).

En la figura 4.4b se muestra más claramente, el zimograma de las catalasas de las etapas vegetativa, T0, T3, T5 y esporas completas, que fueron los puntos del ciclo de vida de la bacteria que se tomaron para analizar las características bioquímicas de las enzimas y compararlas posteriormente.



**Figura 4.4 b.** Zimograma para catalasa. Carril 1: catalasa del crecimiento vegetativo (50 µg), carril 2: T0 (13 µg), carril 3: T3 (6.25 µg), carril 4: T5 (4 µg), carril 5: esporas (50 µg).

De la misma forma, se corrieron muestras de la catalasa extraída del tegumento de las esporas y una muestra del extracto obtenido del protoplasto de estas esporas rasuradas. Se observa una banda correspondiente a la muestra del tegumento (Cat spo-teg) que tiene la misma movilidad electroforética que la catalasa presente en las diferentes etapas del proceso de esporulación (Fig. 4.4b), y se obtuvo de manera separada la catalasa del protoplasto de la espora denominada spo-prot (Fig. 4.5).



**Figura 4.5.** Zimograma de las catalasas de las esporas de *B. cereus*. Carril 1: esporas completas (50 µg), carril 2: protoplasto (65 µg) y carril 3: tegumento (50 µg).

#### 4.4. Determinación del punto isoelectrónico

La determinación del punto isoelectrónico (pI) de las catalasas de las etapas logarítmica, T0, T3, T5 y esporas de *B. cereus* se realizaron calculando la distancia de las bandas en el zimograma y comparándolas con los valores de pH obtenidos en el gradiente formado en el gel.

En la tabla 4.1 se señalan los puntos isoelectrónicos de las diferentes catalasas. La presente en el estado vegetativo, en la fase estacionaria, durante el proceso de esporulación y en las esporas libres son los puntos críticos en los que analizamos las características de las enzimas (ver figura 4.6).

Tabla 4.1. Valores de Punto Isoeléctrico de las diferentes catalasas de *B. cereus*.

Catalasa	pI
Logarítmica	4.14
T0	4.14
T3	4.14
T5	4.14
Esporas completas	4.14
	6.94

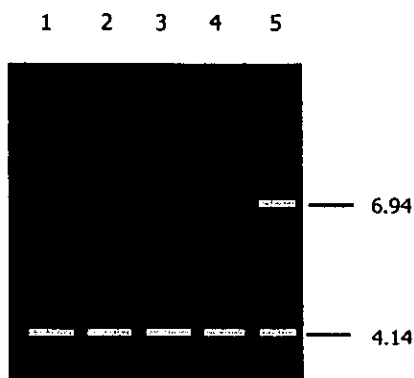


Figura 4.6. Esquema del zimograma para la identificación del pI de las catalasas de *B. cereus*. Carril 1: etapa de crecimiento logarítmico, carril 2: T0, carril 3: T3, carril 4: T5 y carril 5: esporas libres.

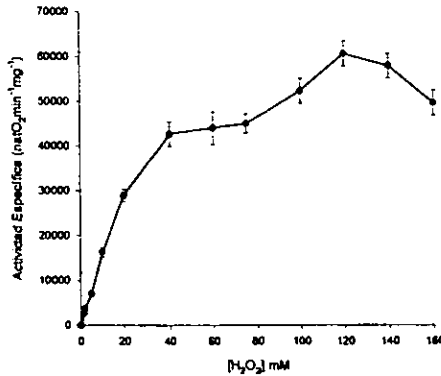
Como se puede observar, las catalasas de las fases del desarrollo de *B. cereus* tienen el mismo punto isoeléctrico, incluyendo a la cat spo-teg. Sólo el extracto de las esporas totales presenta una catalasa adicional con un pI más básico que corresponde a la catalasa del protoplasma o spo-prot.

#### 4.5 Determinación de la $K_M$ y $V_{max}$ de las diferentes catalasas

En la figura 4.7 se muestra un ejemplo del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la catalasa presente en el estado de crecimiento logarítmico de *B. cereus* para obtener la  $K_M$ .

Tabla 4.2. Determinación de  $K_M$  y  $V_{max}$  para  $H_2O_2$  para algunas catalasas de *B. cereus*. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación std,  $n=3$ .

ETAPA	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ natO <sub>2</sub> /min/mg prot
Logarítmica	26 $\pm$ 6	67,000
T5	30 $\pm$ 7	98,000
T6	17 $\pm$ 3	150,000
Esporas totales (spo-Tot)	54 $\pm$ 8	83,000
spo-teg	32 $\pm$ 6	79,000
spo-prot	17 $\pm$ 6	20,000

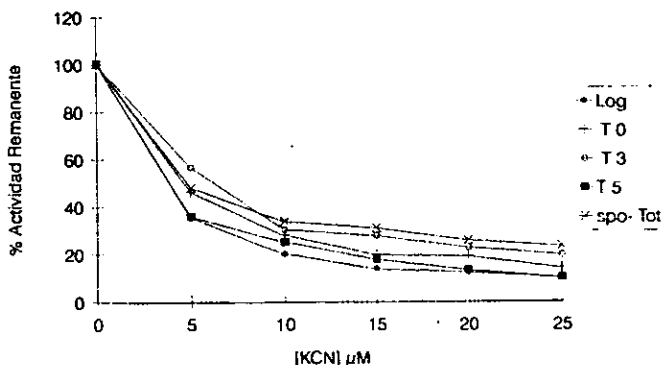


**Figura 4.7.** Efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno sobre la actividad de catalasa presente en el crecimiento logarítmico de *B. cereus*. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación std,  $n=3$ .

La tabla 4.2 muestra los datos obtenidos de  $K_M$  y  $V_{max}$  para las diferentes catalasas presentes en algunas etapas del desarrollo de *B. cereus*. Aparentemente, la  $K_M$  para la catalasa presente durante la etapa logarítmica hasta T5 y la catalasa del tegumento no presentan variación significativa. Sin embargo, en la etapa T6 la  $K_M$  baja y es igual a la de la catalasa del protoplasto de la espora.

#### 4.6. Inhibición de las catalasas con la azida de sodio, el cianuro y el 3-aminotriazol

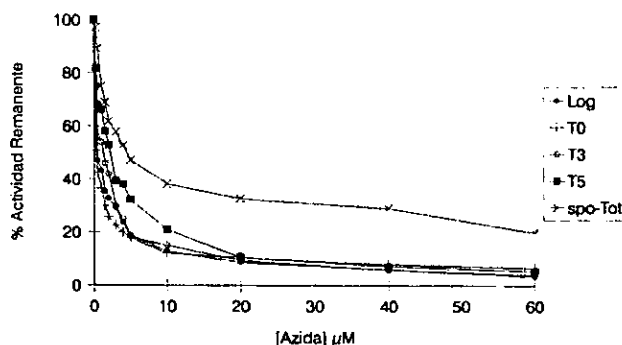
La figura 4.8 muestra la inhibición de las catalasas con cianuro de potasio de los estados: logarítmico, T0, T3, T5 y de las esporas totales presentes en *B. cereus*.



**Figura 4.8** Actividad de las diferentes catalasas en presencia de cianuro de potasio. Las muestras se incubaron en el oxímetro en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 7.4 a 30°C con el inhibidor durante un minuto antes de agregar 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para comenzar el ensayo. Los datos presentados son representativos de experimentos realizados por lo menos en 3 ocasiones a cada concentración.

A bajas concentraciones de KCN las catalasas presentes en T0 se inhiben aproximadamente en un 50% y en T5 y en la fase logarítmica un 65%. Las catalasas de las esporas presentan una mayor resistencia a altas concentraciones de KCN.

La curva de inhibición con azida de sodio se muestra en la figura 4.9.



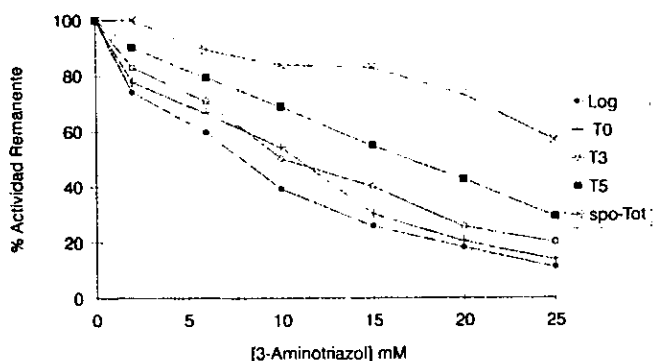
**Figura 4.9.** Inhibición con azida de sodio. Los ensayos se realizaron en amortiguador de fosato de potasio 0.1 M pH 7.4 incubando un volumen de muestra con el inhibidor durante 1 minuto y agregando después el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a una concentración final de 100 mM. Los datos presentados son representativos de experimentos realizados por lo menos en 3 ocasiones a cada concentración.

En esta figura se observa que, las catalasas de las esporas son más resistentes al inhibidor que las catalasas de los estados vegetativo, T3 y T5. Estas últimas enzimas se inhiben rápidamente por la azida mientras que las catalasas de las esporas tienen un 29% de actividad remanente a concentraciones de 40  $\mu\text{M}$ .

El cianuro y la azida son inhibidores comunes de las catalasas, pero se ha estudiado la sensibilidad de las diferentes catalasas al 3-amino 1,2,4 triazol (inhibidor específico de éstas) utilizando varias condiciones de ensayo y concentraciones variadas de este inhibidor que van desde 8 mM hasta 20 mM (Margoliash, y col., 1960). Por ello se sabe que las catalasas típicas o monofuncionales se inhiben con el 3-aminotriazol y que las catalasas-peroxidasas son resistentes a este compuesto (Golberg y Hochman, 1989; Yumoto y col., 1990).

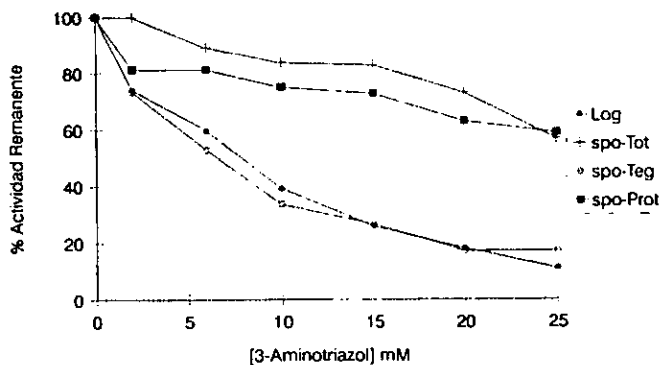
La figura 4.10 muestra la inhibición con el 3-aminotriazol de los estados: logarítmico, etapa estacionaria (T0), T5 y esporas de *B. cereus*.

En esta gráfica se pueden distinguir tres familias de curvas diferentes: 1) las catalasas de la etapa vegetativa, T0 y T3 son más sensibles al inhibidor y poseen el mismo comportamiento. 2) En el estado T5 se ve un aumento en la resistencia de la catalasa al 3-aminotriazol y 3) las catalasas de la espora son aún más resistentes.



**Figura 4.10.** Efecto del 3-aminotriazol sobre la actividad de las diferentes catalasas de *B. cereus*. Los extractos crudos libres de membranas de cada muestra se colocaron en el oxímetro con el inhibidor en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM a pH 7.4 iniciando de manera inmediata la reacción agregando 100 mM de  $H_2O_2$ . Los datos presentados son representativos de experimentos realizados por lo menos en 3 ocasiones a cada concentración.

Para investigar cuál de las dos catalasas le confería la resistencia al inhibidor en las esporas, se analizó la cinética de la catalasa spo-prot y spo-teg por separado. Los resultados se muestran en la figura 4.11.

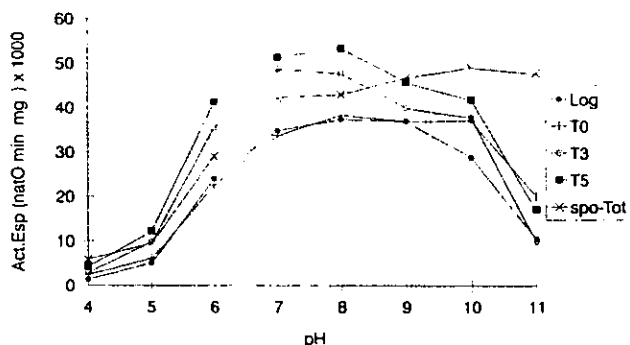


**Figura 4.11.** Inhibición con 3-aminotriazol. Las muestras se colocaron en el oxímetro con concentraciones crecientes del inhibidor en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM a pH 7.4 e iniciando la reacción de manera inmediata al agregar 100 mM de  $H_2O_2$ . Los datos presentados son representativos de experimentos realizados por lo menos en 3 ocasiones a cada concentración.

En esta figura se ve claramente que la catalasa del protoplasto de la espora es la que presenta mayor resistencia. Se inhibe en un 41% aún a concentraciones de 25 mM. Sin embargo, la catalasa del tegumento presenta un comportamiento idéntico al de la catalasa vegetativa lo que refuerza la posibilidad de que se trate de la misma enzima.

#### 4.7 Determinación del pH óptimo de las catalasas de *B. cereus*

Se utilizó la mezcla de tres componentes en la que la fuerza iónica varía poco con el pH (Mes 100 mM, Tris 50 mM y etanolamina 50 mM) trabajando en el intervalo de 4 a 11. En la gráfica 4.12 se muestra la actividad de las catalasas en la mezcla anterior.



**Figura 4.12.** Determinación de la actividad específica de las catalasas en función del pH. Las muestras se incubaron en el oxímetro con amortiguador: MES 100 mM, Tris 51 mM, etanolamina 51 mM a varios valores de pH durante un minuto antes de comenzar el ensayo añadiendo 100 mM de  $H_2O_2$ .

En la gráfica se observa que las catalasas presentan una meseta de actividad en los valores de pH de 6.5 a 9. Sin embargo, las catalasas de las esporas tienen un comportamiento atípico, mostrando una mayor estabilidad a valores de pH básicos.

#### 4.8. Determinación de la actividad de peroxidasa

##### 4.8.1 Espectrofotométricamente

Para confirmar la presencia de una catalasa-peroxidasa en el protoplasto de la espora se midió la actividad de peroxidasa espectrofotométricamente mediante la oxidación de pirogalol. Los resultados se muestran en la tabla 4.3.

**Tabla 4.3.** Actividad de peroxidasa de las diferentes catalasas presentes en las etapas del desarrollo de *B. cereus*. Los datos presentados son representativos de experimentos realizados por lo menos en 3 ocasiones.

MUESTRA	nmoles purpurogalina/min/mg prot.
Logarítmica media	7.95
T0	9.17
T3	8.88
T5	17.54
Spo-tot	31.32
Spo-prot	35.26
Spo-teg	6.75

Estos datos nos indican que la catalasa del tegumento de la espora es una catalasa típica (no tiene actividad peroxidativa significativa) y que en el protoplasto hay una catalasa-peroxidasa. Además esto nos sugiere que la enzima spo-prot se empieza a sintetizar en la etapa T5 debido al aumento en la actividad peroxidativa (Figura 4.13).

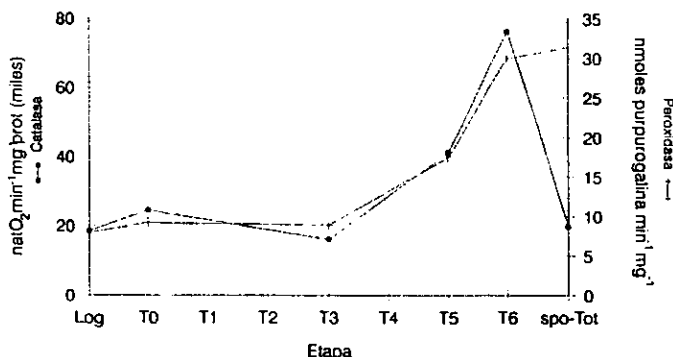


Figura 4. 13 Gráfica de actividad de catalasa vs. Actividad de peroxidasa con pirogalol.

#### 4.8.2 Zimograma

Los datos de que la catalasa del protoplasto de la espora es una catalasa-peroxidasa, se confirman con la aparición de una banda en el gel revelado con diaminobenzidina (Fig. 4.14).

Este zimograma muestra que las bandas reveladas para actividad de peroxidasa coinciden en las muestras de esporas totales (spo-tot) y spo-prot, así como que la aparición de esta enzima puede darse durante la etapa de esporulación T5.

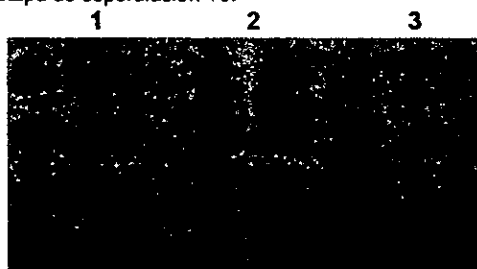


Figura 4.14. Revelado para actividad de peroxidasa. Carril 1: spo-tot, carril 2: spo-prot y carril 3: T5. Todos los carriles se cargaron con 200 µg de proteína.

#### 4.9. Obtención de las fracciones semipuras de las diferentes catalasas de las esporas

Con el fin de diferenciar y caracterizar bioquímicamente las catalasas de las esporas de *B. cereus*, se trató de establecer un método de purificación para la catalasa del protoplasto y para la del tegumento de la espora.

##### 4.9.1 Purificación parcial de la catalasa del protoplasto de la espora (spo-prot)

La precipitación con acetona resultó ser un método útil con el cual nos deshacemos de aproximadamente un 20% de la cantidad de proteína total después de centrifugar. El precipitado del 70% de sulfato de amonio fue donde encontramos la actividad de la catalasa y fue la fracción que se hizo pasar por la columna de fenil-sefariosa (Tabla 4.4).

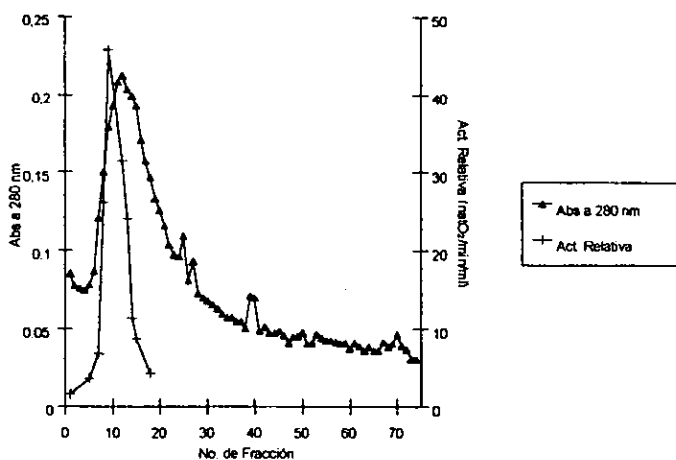
La figura 4.15 muestra el perfil de elución de la columna de fenil-sefariosa. Como se puede observar, casi toda la proteína sale al principio de la elución y al medirle la actividad de catalasa, ésta se obtuvo en las primeras fracciones por lo que se hizo un pool de la fracción 8 a la 13 y con este se trabajó posteriormente. Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida no

desnaturalizantes para observar el número de bandas de la proteína presentes así como para evidenciar la actividad de catalasa y de peroxidasa de la muestra.

En la tabla 4.4 se muestra los pasos de purificación de la catalasa spo-prot y la tabla 4.5 muestra los mismos parámetros pero para la actividad de peroxidasa de la misma enzima.

**Tabla 4.4.** Purificación de la catalasa spo-prot. Referida como  $\text{natO}_2/\text{min}$

MUESTRA	Proteína mg/ml	Volúmen ml	Act. Especifica $\text{natO}_2/\text{min}/\text{mg}$	Act. Total $\text{natO}_2/\text{min}$	Veces de purificación	Rendimiento %
E. crudo	3.09	30	19,014	1' 762,598	1	100
pp acetona	2.71	25	23,486	1' 591,176	1.23	90.3
pp 70%	2.82	6	29,804	504,284	1.57	28.61
Fenil-sefarosa	0.2054	6	166,855	205,632	8.77	11.66



**Figura 4.15.** Perfil de elución de la columna de Fenil-sefarosa. Se muestra también la actividad de catalasa de algunas fracciones.

**Tabla 4.5.** Actividad de peroxidasa en la purificación de spo-prot.

MUESTRA	Act. específica nmoles purpurogalina/ min/mg	Act. total nmoles purpurogalina/ min	Veces de purificación	Rendimiento %
E. crudo	31.32	2,903	1	100
pp acetona	92.05	6,236	2.94	214
pp 70%	124.15	2,100	3.96	72.34
Fenil-sefarosa	247.89	305.5	7.91	10.52

Los resultados de las veces de purificación de ambas actividades así como los datos de actividad de peroxidasa de la misma muestra, tanto al medir la actividad espectrofotométricamente como al revelarla en el gel con diaminobenzidina, nos sugieren que podría tratarse de la misma enzima: una catalasa-peroxidasa.

Para comprobar que la catalasa de la espora spo-prot se trataba de una catalasa-peroxidasa se midió la actividad de peroxidasa con varios sustratos tanto en un extracto crudo como en la fracción semipurificada de esta enzima. Los resultados se muestran en la tabla 4.6.

Tabla 4.6. Actividad de peroxidasa con diferentes sustratos.

Sustrato	Pirogalol	Guaiacol	O-dianisidina	Ascorbato	NADPH
Muestra	(nmoles de sustrato oxidado $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )				
Spo-prot	31.32	4.88	11.52	ND	ND
Fenil-sefarosa	247.89	17.02	31.45	ND	ND

ND= no detectada.

#### 4.9.2 Extracción de la catalasa del tegumento (spo-teg)

Como la catalasa del tegumento de la espora es una catalasa típica, se puede extraer fácilmente con un tratamiento de solventes (metanol / cloroformo), este método fue muy útil para poder obtener una fracción semipurificada de esta enzima, los resultados se muestran en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Purificación parcial de la catalasa del tegumento de la espora (spo-teg) de *B. cereus*.

MUESTRA	Proteína mg/ml	Volúmen ml	Act. Específica. $\text{natO}_2/\text{min}/\text{mg}$	Act. Total	Veces de purificación	Rendimient o %
Ext. tegumento	0.964	7	79,293	535,069	1	100
Extracción solventes	0.0448	10.5	910,714	428,400	11.5	80

En la figura 4.16 se muestra el zimograma donde se comparan las actividades de la catalasa spo-prot y de la spo-teg así como el gel de proteínas en la obtención de las fracciones parcialmente purificadas.

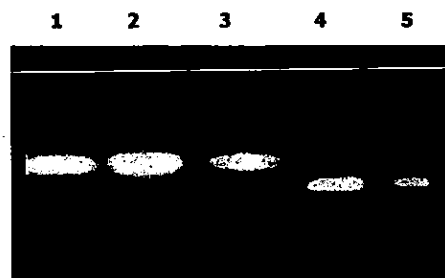
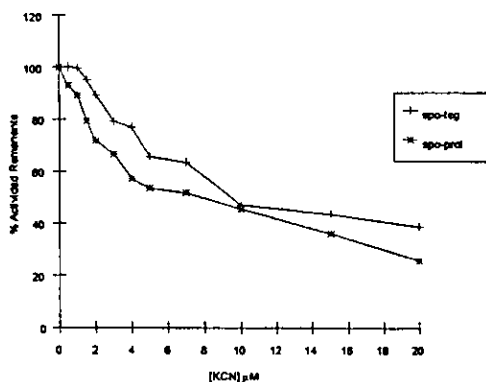


Figura 4.16. Zimograma del proceso de purificación de las catalasas de las esporas de *B. cereus*. Carril 1: spo-prot 108  $\mu\text{g}$ , carril 2: pp70% spo-prot 99  $\mu\text{g}$ , carril 3: spo-prot Fenil sefarosa 7  $\mu\text{g}$ . Carril 4: spo-teg, 34  $\mu\text{g}$ , carril 5: spo-teg extracción con solventes 2  $\mu\text{g}$ .

#### 4.9.3 Inhibición de las catalasas de las esporas con azida, cianuro y 3-aminotriazol

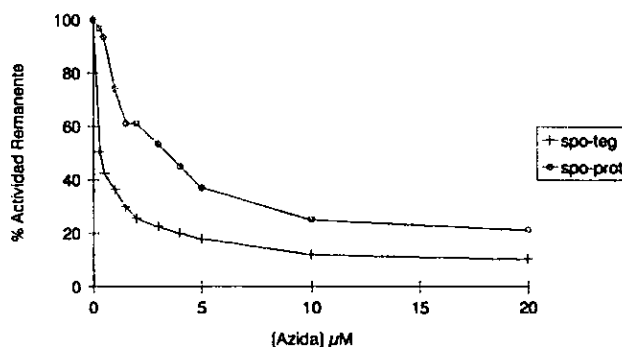
La figura 4.17 muestra la gráfica de inhibición con cianuro de potasio de las dos catalasas (semipurificadas) presentes en las esporas de *B. cereus*.



**Figura 4.17.** Actividad de las catalasas semipurificadas de las esporas de *B. cereus* en presencia de cianuro de potasio. Las muestras se incubaron durante un minuto en el oxímetro con el inhibidor en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM a pH 7.4 a 30°C. Posteriormente se le añadió 100 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para iniciar la reacción. Los datos presentados son representativos de experimentos realizados por lo menos en tres ocasiones a cada concentración.

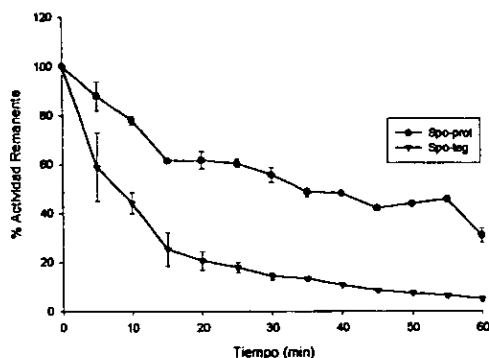
En esta gráfica se puede observar que las dos enzimas tienen un 50% de inhibición con una concentración similar de cianuro, 9.5  $\mu\text{M}$  para la spo-teg y 8  $\mu\text{M}$  para la spo-prot.

La inhibición de las catalasas spo-teg y spo-prot con azida de sodio se muestra en la figura 4.18.



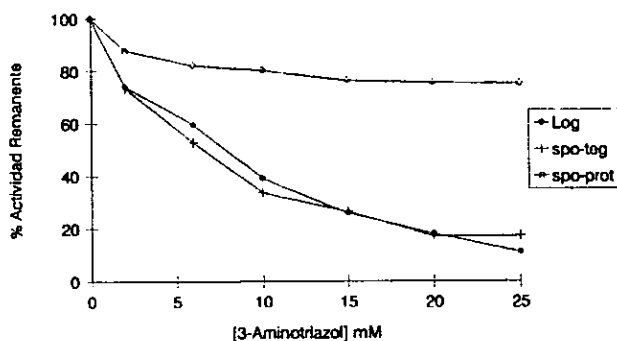
**Figura 4.18.** Inhibición con azida de sodio. Las muestras se incubaron con el inhibidor en amortiguador de fosatos de potasio 100 mM a pH7.4 durante un minuto antes de comenzar el ensayo añadiendo 100 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La figura 4.19 muestra la inhibición de las dos catalasas con 5 mM de 3-aminotriazol en presencia de ascorbato a una concentración de 4 mM durante 60 minutos de incubación.



**Figura 4.19.** Cinética de inhibición de las catalasas spo-teg y spo-prot con 3-aminotriazol (Margolash, y col., 1960). Las muestras semipurificadas se incubaron a 37°C con 5 mM de 3-aminotriazol, 4 mM de ascorbato de sodio y 4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM a pH 7.4. Se fueron tomando alícuotas cada 5 minutos y se les midió actividad de catalasa en el oxímetro. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación std, n=3.

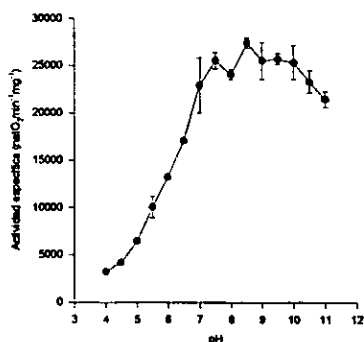
En esta gráfica se puede observar que la catalasa spo-prot presenta una resistencia mayor al inhibidor, comparada con la inhibición rápida que presenta la catalasa spo-teg, que es una catalasa típica. La tendencia puede verse más claramente en las gráficas de dosis-respuesta de las dos enzimas frente al inhibidor (Fig. 4.20), en la que la catalasa del protoplasto de la espora se inhibe en un 25% aún a concentraciones de 25 mM mientras que la spo-teg se inhibe en un 75% a la misma concentración.



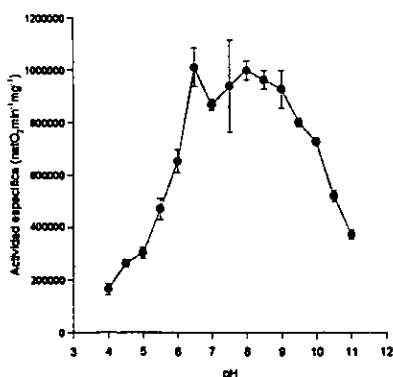
**Figura 4.20.** Inhibición con 3-aminotriazol de las catalasas de las esporas de *B. cereus*. Se muestra además como referencia la actividad de la catalasa de la etapa vegetativa. Los fracciones semipurificadas de cada muestra se colocaron en el oxímetro con el inhibidor en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM a pH 7.4 iniciando de manera inmediata la reacción agregando 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos presentados son representativos de experimentos realizados por lo menos en 3 ocasiones a cada concentración.

#### 4.9.4 Determinación del pH óptimo

Las gráficas 4.21 y 4.22 muestran la actividad de las catalasas spo-prot y spo-teg, respectivamente.



**Figura 4.21** Determinación de la actividad de la catalasa spo-prot en función del pH. La enzima semipurificada se incubó en el oxímetro con un amortiguador que mantiene la fuerza iónica constante: MES 100 mM, Tris 51 mM, etanolamina 51 mM a varios valores de pH durante un minuto antes de comenzar el ensayo añadiendo 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos se presentan como promedio ± desviación std, n=3.



**Figura 4.22** Actividad de la catalasa spo-teg en función del pH. La muestra semipurificada se incubó en el oxímetro con un amortiguador que mantiene la fuerza iónica constante: MES 100 mM, Tris 51 mM, etanolamina 51 mM a varios valores de pH durante un minuto antes de comenzar el ensayo añadiendo 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos se presentan como promedio ± desviación std, n=3.

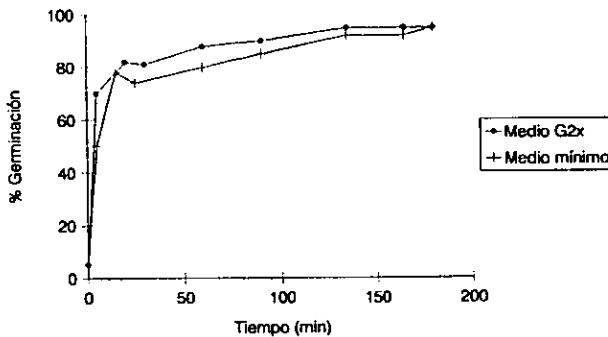
La catalasa del tegumento mostró un comportamiento independiente del pH, en el intervalo entre 6.5 y 9; mientras que la spo-prot va incrementando su actividad haciéndose similar entre los valores de pH 7.5 y 10 pero no tiene un pH óptimo claro.

#### 4.10. Papel de la catalasa spo-teg en la germinación y el crecimiento logarítmico

Para conocer la función que desempeña la catalasa del tegumento de la espora durante la germinación se incubaron esporas tanto íntegras como esporas a las cuales se les ha quitado el tegumento en un medio con germinantes y en un medio G2x, también con germinantes.

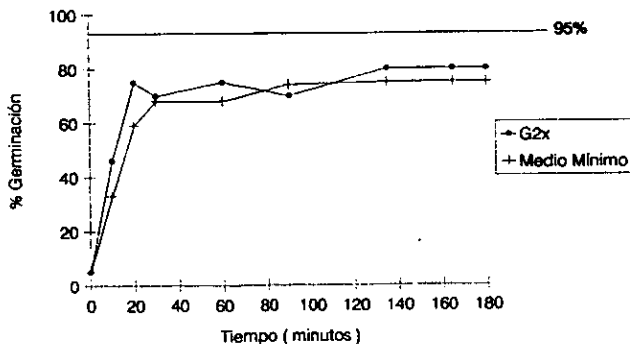
##### 4.10.1. Germinación

Las figuras 4.23 y 4.24 muestran los porcentajes de germinación de las esporas íntegras y las rasuradas (sin tegumento), respectivamente, incubadas en los dos tipos de medio.



**Figura 4.23** Porcentaje de germinación de esporas íntegras en medio G2x y medio mínimo con germinantes. 40 mg (peso seco) de esporas se resuspendieron en un volumen de amortiguador de fosfatos 25 mM a pH 7.4 para someterlas a choque térmico agregándoles posteriormente un volumen igual de medio mínimo o medio G2x (según sea el caso) e incubárlas en agitación a 30°C durante 3 horas. A ambos medios se les agregó como germinantes: alanina 40 mM y adenosina 2 mM. Se tomaron las alícuotas y se observaron al microscopio óptico.

Como se puede observar, el proceso de germinación se lleva a cabo durante los primeros 20 minutos (en los dos casos), pero es un poco más rápida en las esporas íntegras. Las esporas rasuradas (sólo con cat spo-prot) germinan entre el 75 y 80% en medio mínimo y en medio G2x respectivamente (Fig. 4.24). En cambio, las esporas íntegras tienen un 95% de germinación en ambos medios (Fig. 4.23).



**Figura 4.24** Porcentaje de germinación de esporas rasuradas incubadas en medio mínimo y en G2x con germinantes. 40 mg (peso seco) de esporas se resuspendieron en un volumen de amortiguador de fosfatos 25 mM a pH 7.4 para someterlas a choque térmico agregándoles posteriormente un volumen igual de medio mínimo o medio G2x (según sea el caso) e incubárlas en agitación a 30°C durante 3 horas. A ambos medios se les agregó como germinantes: alanina 40 mM y adenosina 2 mM. Se tomaron las alícuotas y se observaron al microscopio óptico.

#### 4.10.2 Actividad de catalasa en medio de cultivo G2x

Al analizar la actividad de la catalasa de las esporas íntegras y sin tegumento, germinadas en medio G2x, se observa que la actividad de la enzima en esporas íntegras es ligeramente mayor que la encontrada en las esporas rasuradas. Así también, se puede ver que la densidad óptica del cultivo va aumentando con el tiempo de incubación y que el momento en el que ocurre la primera división celular no se vio afectada por el tratamiento con el detergente presentándose a los 90 minutos en los dos tipos de esporas (Fig. 4.25).

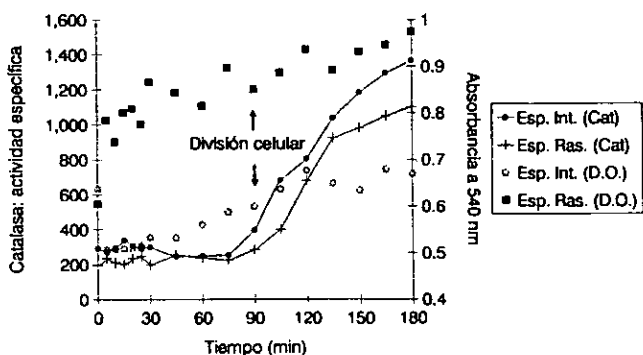


Figura 4.25. Curso temporal de la actividad de catalasa en esporas íntegras (.) y sin tegumento (+) incubadas en medio G2x con germinantes (alanina 40 mM y adenosina 2 mM). Se muestra la densidad óptica de cada cultivo por esporas íntegras (\*) y rasuradas (□). La actividad específica de catalasa está expresada en nátomos de oxígeno/ minuto / 40 mg de peso seco. Las flechas indican el momento en el que se observó la primera división celular. Los datos presentados son representativos de experimentos realizados por lo menos en 3 ocasiones.

#### 4.10.3 Actividad de catalasa en medio mínimo con germinantes

Comparando la misma actividad de catalasa, de esporas íntegras y sin tegumento, pero ahora en medio sólo con germinantes, se observa que ambas actividades tienden a mantenerse constantes durante todo el tiempo de incubación. Estos resultados se muestran en la figura 4.26.

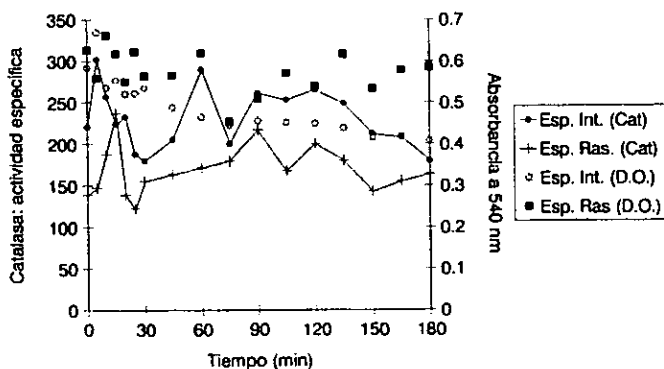


Figura 4.26. Comportamiento de la actividad de catalasa con respecto al tiempo en las esporas íntegras (+) y las esporas sin tegumento (.) incubadas en medio mínimo usando 40 mM de alanina y 2 mM de adenosina, como germinantes. Se muestra además la densidad óptica de los cultivos. Los datos presentados son representativos de experimentos realizados por lo menos en 3 ocasiones.

## 5. DISCUSION

### 5.1 Expresión de isoenzimas durante el ciclo de vida de *Bacillus cereus*

Se han detectado cambios en la actividad y en el patrón de las isoenzimas de catalasa relacionados a la diferenciación celular y a diferentes condiciones de tensión metabólica.

En el ciclo de vida de *Bacillus cereus* se observó la expresión diferencial de dos isoenzimas durante el proceso de diferenciación celular, éste fenómeno se presenta también en otros microorganismos como *Escherichia coli* (Farr y col., 1988) y *B. subtilis* (Loewen y Switala, 1987<sup>1,2</sup>, 1988). La cat-1 está presente en la fase de crecimiento exponencial y se sobreexpresa al final de la etapa logarítmica y además se secreta al medio durante la fase estacionaria (Nacleiro, y col., 1995). La cat-2 únicamente se encuentra en las esporas.

#### Ciclo de vida.

La espora de *B. cereus* como entidad latente, tiene una actividad metabólica basal que se incrementa al encontrarse en las condiciones aptas para su germinación. Simultáneamente a este incremento, suponemos que la catalasa spo-prot desaparece para solamente expresar la catalasa vegetativa, que es la enzima del crecimiento logarítmico.

Estos datos se apoyan en el hecho de que en *B. subtilis* se presenta una catalasa exclusiva de las esporas (kat-x) que deja de ser transcrita y entonces se transcribe nuevamente el gen kat-A (la catalasa del estado vegetativo) 20 minutos después del inicio de la germinación de la espora (Bagyan y col. 1998).

De acuerdo a nuestros resultados, la actividad de catalasa no se incrementa hasta la etapa T3-4 de esporulación; el máximo de actividad lo encontramos en el estado T6, que corresponde a un mínimo en los valores de la respiración aerobia; por lo cual, el aumento en la catalasa está más bien relacionado con las etapas de maduración de la espora. (Fig. 4.2).

Se sabe que kat E de *B. subtilis* (el gen que codifica para la catalasa cat-2) y kat E en *E. coli* se regulan de manera similar pero los genes se controlan por diferentes factores  $\sigma$ ,  $\sigma^B$  y  $\sigma^S$  respectivamente. Estos factores regulan además un número de genes que se inducen en la etapa de crecimiento estacionario. El papel fisiológico de esos genes es conferir la resistencia a los múltiples factores adversos a los que están sometidas las células en este estado; la síntesis de kat E de *B. subtilis* se induce por calor, etanol o sales así como por la falta de glucosa en el medio (Engelman y col., 1995).

Adicionalmente a los resultados de la variación de la actividad, encontramos que la catalasa presente en el crecimiento logarítmico y durante las fases de la esporulación no se excreta al medio de cultivo como sucede en *Bacillus subtilis* en donde la catalasa del crecimiento vegetativo (Cat 1) es secretada al medio durante la fase estacionaria para completar su protección contra el estrés oxidativo (Nacleiro, y col. 1995).

En las esporas libres de *B. cereus* se detectaron 2 enzimas de catalasa, una de mayor movilidad electroforética denominada spo-teg porque se encuentra en el tegumento de la espora y coincide con la banda de la catalasa del crecimiento logarítmico. La otra isoenzima tiene una movilidad menor y se encuentra en el protoplasto de la espora por lo que se le llamó spo-prot.

A pesar de que la catalasa del protoplasto se encuentra presente en cantidades muy limitadas (su actividad específica es de ~4 veces menor comparada con la actividad de la catalasa del tegumento de la espora) parece ser que la importancia fisiológica sería eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado durante la germinación para eventualmente desaparecer y ser sustituida por la cat-veg, la cual persiste en la etapa vegetativa y en las fases de la esporulación, inclusive en la espora libre (Fig. 4.4a y b).

Debido a esta diferencia en la compartimentalización de las enzimas de las esporas, se pudieron obtener de manera separada fracciones con cada tipo de enzima para caracterizarlas posteriormente. La catalasa del tegumento se extrajo con un tratamiento con detergente y a las esporas "rasuradas" (obtenidas después de este proceso) se rompieron para obtener la fracción del protoplasto que contiene a la spo-prot.

### Germinación

Las esporas rasuradas (sólo con la catalasa-peroxidasa spo-prot) tienen un porcentaje de germinación más bajo que las esporas integrales (aproximadamente un 20%) (Fig. 4.24). Esto nos puede sugerir que la catalasa del tegumento (spo-teg) y/u otros componentes, son necesarios para que las esporas germinen adecuadamente. Es probable que el tratamiento con el detergente haya dañado algunas de las células.

Por otro lado, al comparar la actividad específica de catalasa en las esporas integrales incubadas en el medio mínimo o en el medio G2x se ve que, la actividad en el medio de cultivo (G2x) va en aumento mientras que en el medio con sales la actividad se mantiene casi constante. Esto era de esperarse debido a que el metabolismo de una célula vegetativa es mayor al de una espora germinada y por lo tanto aumentó también la generación de EROS en las células (Fig. 4.25 y 4.26).

Durante la germinación de las esporas de *B. cereus* se detectó un aumento en la actividad de catalasa aproximadamente a los 80 minutos, tiempo en el cual ocurre la primera división celular.

Sabemos que ese aumento corresponde a la presencia de la catalasa en el estado vegetativo; sin embargo, no pudimos identificar en los zimogramas el momento del reemplazo de la catalasa spo-prot por la catalasa vegetativa. Esto fue debido a que la actividad de la catalasa presente en las células germinadas (primarias) es muy pequeña y a que las técnicas utilizadas para romper a las mismas fueron ineficientes para liberar la cantidad suficiente de enzima que pudiera evidenciarse mediante los zimogramas.

Al comparar la misma actividad de catalasa de las esporas integrales y sin tegumento, pero en un medio sólo con germinantes, las actividades se mantienen constantes. Los resultados indican que las células cuentan con la misma actividad presente en el momento de la germinación hasta la formación de la célula primaria.

### **5.2 Características cinéticas de las catalasas**

Existen microorganismos que tienen dos catalasas con diferentes funciones. Una catalasa monofuncional o típica que sólo dismuta peróxido de hidrógeno y una catalasa-peroxidasa que además utiliza al  $H_2O_2$  para oxidar una gran variedad de compuestos (Hochman y Shemesh, 1987).

De acuerdo en los análisis hechos para *B. cereus* se vio que la catalasa vegetativa presente también en el tegumento de las esporas, se trata de la misma enzima: una catalasa típica; y que la catalasa del protoplasto de la espora es una catalasa-peroxidasa.

Este hecho lo descubrimos inicialmente debido a que la catalasa del protoplasto de las esporas presentó una resistencia al inhibidor específico de estas enzimas, el aminotriazol, (Fig. 4.11). Nuestros resultados se confirmaron al realizar el análisis de actividad de peroxidasa con pirogalol (Tabla 4.3) se muestra que la actividad de peroxidasa se incrementa conforme avanza el proceso de esporulación. Los zimogramas revelados para la actividad de peroxidasa nos demostraron la actividad de esta enzima, así como que esta catalasa se podría empezar a sintetizar durante la etapa T5 ya que se observa una banda con la misma movilidad electroforética que la enzima de las esporas y la de la catalasa spo-prot en su fracción

parcialmente pura (Fig. 4.14). Estas bandas reveladas con tetrametilbencidina coinciden con las bandas reveladas para actividad de catalasa en los zimogramas para las muestras de esporas totales y spo-prot semipura.

Adicionalmente se encontró que la catalasa-peroxidasa spo-prot tiene capacidad peroxidativa con los donadores de electrones comunmente usados: el pirogalol, el guaiacol y la o-dianisidina pero no con ascorbato y NADPH. Sobre este aspecto, aún no se ha identificado el sustrato o sustratos naturales para este tipo de peroxidasas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

El análisis del tratamiento de las catalasas con disolventes (etanol/cloroforno) resultó ser una herramienta útil para obtener una fracción con una actividad importante de la catalasa del tegumento ya que ésta al ser una catalasa típica, es resistente a este tipo de tratamiento mientras que la catalasa del protoplasto de la spora (igual que otras catalasas-peroxidasas reportadas) no sobreviven a él (Goldberg y Hochman, 1989).

Sobre el aspecto de purificación de las enzimas de las esporas, cabe aclarar que aunque en los geles de proteína no se observa a las catalasas (spo-prot y spo-teg) totalmente puras, estas muestras parcialmente purificadas nos fueron de gran utilidad para tratar de diferenciarlas y caracterizarlas bioquímicamente.

Los valores de  $K_M$  encontrados para nuestras enzimas concuerdan con lo reportado para las diferentes catalasas ya que las enzimas monofuncionales tienen valores de  $K_M$  mayores para el  $H_2O_2$  que las catalasas-peroxidasas. Sin embargo, el valor de  $K_M$  (17 mM) encontrado para la catalasa-peroxidasa de *B. cereus* es ligeramente mayor al reportado para otras enzimas de este tipo como la de *K. pneumoniae* y para la catalasa-peroxidasa presente en el bacilo alcalófilo YN-2000 que tienen una  $K_M$  de 6.6 mM, valor similar al encontrado para la catalasa de *E. coli* (HPI) de 3.9 mM y la de *R. capsulatus* y *Synechococcus* PCC7942 que son de 4.2 mM (Yumoto, y col., 1990) (Matsuda, y col., 1996) (Hochman y Goldberg, 1991).

En *B. subtilis*, las  $K_M$  son de 40.1 mM y 78 mM para cat-1 y cat-2, respectivamente (Loewen y Switala, 1987<sup>1</sup>, 1987<sup>2</sup>). El valor de  $K_M$  (54 mM) encontrado para las catalasas de las esporas de *B. cereus* se encuentra dentro de estos valores.

Se han reportado los valores de punto isoeléctrico (P.I.) para las catalasas-peroxidasas de *Halobacterium halobium*, 3.8; 5.2 para la de *Vitreoscilla* y 4.5 para la de *Rhodopseudomonas capsulata* (Gjesing, 1991; Abrams y Webster, 1990; Hochman y Shemesh, 1987). Sin embargo, encontramos que la catalasa-peroxidasa de *B. cereus* tiene un P.I. básico (de 6.4) y que la que presenta un valor ácido es la catalasa típica presente durante todo el ciclo de vida de la bacteria e incluso en el tegumento de las esporas, su valor es de 4.14.

Al analizar el efecto del pH sobre la actividad de catalasa, se encontró que la catalasa del estado vegetativo, que persiste en el proceso de esporulación e incluso se encuentra en el tegumento, tiene un comportamiento independiente del pH con una meseta entre 6.5 y 9; mientras que la catalasa del protoplasto de la spora va incrementando su actividad haciéndose similar entre los valores de pH 7.5 y 10 pero no tiene un pH óptimo claro. Los resultados para la cat-veg y la spo-teg coinciden con lo reportado para otras catalasas típicas, sin embargo, el comportamiento que presenta la spo-prot es atípico ya que la actividad de catalasa es extremadamente dependiente del pH para las catalasas-peroxidasas de otros microorganismos. No obstante, los ensayos reportados en la bibliografía se realizaron en condiciones de bajo poder amortiguador en algunos valores de pH, así como que la fuerza iónica del amortiguador no se encontraba controlada (amortiguador de fosfatos) (Loewen y Switala, 1987<sup>2</sup>, 1988).

Sobre este aspecto, Nadler y col (1986) reportaron que algunos componentes presentes en el amortiguador de reacción podrían afectar la forma que presenta la curva de actividad frente al pH.

Al realizar nuestros ensayos en las condiciones anteriormente señaladas (de bajo poder amortiguador) las dos enzimas muestran el comportamiento típico de cada especie; la catalasa del estado vegetativo y spo-teg muestran nuevamente una meseta de actividad en los valores de

pH de 6 a 11, mientras que la spo-prot presenta una curva típica de campana siendo su pH óptimo de 7.5.

Se han reportado al cianuro y a la azida como inhibidores comunes de las catalasas y las catalasas-peroxidasas (por ser hemoproteínas) (Margoliash y col., 1960).

No obstante, cabe mencionar que no existe un patrón general de inhibición con cianuro para las catalasas reportadas de diferentes organismos. La concentración para lograr el 50% de inhibición para estas enzimas (tanto típicas como las catalasas-peroxidasas) va desde 3 mM para la catalasa de *Penicillium simplicissimum* (Fraaije y col., 1996) hasta 100  $\mu$ M para la catalasa-peroxidasa de *Bacillus alcalófilo* (Yumoto y col., 1990) y para la cat-2 de *B. subtilis* (Loewen y Switala, 1988), por lo tanto la concentración de este compuesto necesaria para inhibir a nuestras enzimas en el mismo porcentaje está por debajo de los valores indicados (Fig. 4.8).

Igual que para la inhibición con cianuro, no existe un patrón típico o general para la inhibición con azida de las catalasas reportadas en otros microorganismos, el intervalo de concentraciones para obtener un 50% de inhibición va desde 1.1  $\mu$ M para la catalasa-peroxidasa y 27.5  $\mu$ M para la catalasa típica, ambas de *Klebsiella pneumoniae* (Goldberg y Hochman, 1989) hasta 150  $\mu$ M para la catalasa-peroxidasa de *Rhodopseudomona capsulata* (Hochman y Shemesh, 1987) y para la de *Vitreoscilla* (Abrahams y Webster, 1990). Nuestros resultados muestran que la catalasa presente en el tegumento de las esporas de *B. cereus* es un poco más sensible a la azida ya que presenta un 50% de actividad remanente a concentraciones de 0.3  $\mu$ M. En cambio la catalasa del protoplasto de la espóra necesita una concentración 10 veces mayor para inhibirse en el mismo porcentaje (Fig. 4.18).

### 5.3 Posible papel de las catalasas en *B. cereus*

Se ha reportado que las catalasas-peroxidasas fueron el primer sistema que tenía la función de descomponer el  $H_2O_2$  debido a que éstas se han encontrado presentes en las cianobacterias y a que muchos organismos procariontes sólo presentan este tipo de sistema antioxidante y no peroxidasas que atrapen los peróxidos (Klotz y col., 1997).

*E. coli* sintetiza dos enzimas diferentes con actividad de catalasa, una monofuncional (HPII) y una catalasa-peroxidasa (HPI) las cuales se regulan de manera distinta.

El nivel de la HPI se incrementa en respuesta al peróxido de hidrógeno externo, y la HPII se incrementa de 10 a 20 veces durante la fase estacionaria. Esto sugirió que la HPII funcionaba en las células sin crecimiento, mientras que la HPI cumplía un papel general de antioxidante en la fase de crecimiento logarítmico con un efecto específico sobre la función y estructura de la membrana (Loewen y col., 1985).

Algunos ejemplos más mostraron que algunas catalasas no tienen una función crucial en el crecimiento activo de los cultivos, a menos que las células se expongan a  $H_2O_2$  externo y en algunos otros organismos como *R. capsulatus*, la descomposición del peróxido formado durante el crecimiento exponencial depende de manera importante de la presencia de una peroxidasa.

En la bacteria aeróbica *Vitreoscilla sp.* la catalasa-peroxidasa tiene como función principal el dismutar el peróxido de hidrógeno generado por su hemoglobina (Abrams y Webster, 1990).

De manera similar, se sugiere que las catalasas-peroxidasas funcionan en algunos organismos, principalmente como peroxidasas catalizando la oxidación de algunos sustratos importantes como el NADH o NADPH o participando en algunas vías del metabolismo degradativo o regulando el estado redox de la célula ya que puede oxidar nucleótidos de piridina (Hochman y Goldberg, 1991).

Apoyados en el hecho de la diferencia en la presencia, características y compartimentalización de las catalasas durante el ciclo de vida y en las esporas de *B. cereus*, pensamos que cada una de ellas tiene una función específica dentro de la bacteria.

Nuestro trabajo muestra que la catalasa típica está presente durante el crecimiento logarítmico, incrementa su actividad sólo en las últimas etapas del proceso de esporulación y se encuentra en el tegumento de la espora. Esto indica que el papel de la enzima sería contrarrestar el  $H_2O_2$  formado durante el crecimiento exponencial y durante el proceso de maduración de la espora.

Por otra parte, la catalasa-peroxidasa presente en el protoplasto de la espora libre (spo-prot) podría tener como función principal el contrarrestar los efectos de las posibles EROS producidos durante la transición de la latencia a la activación del metabolismo germinal o bien debido a la capacidad de oxidar varios sustratos, pueda tener un papel en la regulación del estado redox de la célula.

Sugerimos que la enzima spo-prot se expresa, de acuerdo con nuestras determinaciones, al final de la esporulación. Pensamos que esta enzima podría ser producto de la activación de un gen muy tardío de este proceso y es conocido que la expresión diferencial de estos genes depende de algunos de los factores  $\sigma$  específicos que sólo se expresan en la etapa que les corresponde y que reconocen de manera específica sólo ciertos promotores.

Posterior a la germinación, esta enzima sería remplazada por la catalasa típica para funcionar en el crecimiento vegetativo, lo cual es un indicio de que las dos enzimas se regulan de manera distinta. Así pues, esta es una enzima que se nos presenta como un atractivo tema para su estudio posterior con técnicas de biología molecular: aislando, clonando y secuenciando los genes que codifican a las diferentes catalasas para analizar su expresión y regulación transcripcional durante la esporulación y frente a diferentes condiciones de estrés.

Nuestras sugerencias se basan en las investigaciones de Bagyan y colaboradores (1998) en *B. subtilis* que reportan la presencia del gen Cat-x, que aunque su producto no ha sido caracterizado, se ha visto que se expresa entre 1.5 y 2 horas después de la inducción de la esporulación, encontrándose en las esporas maduras. Es activo durante los primeros minutos de la germinación de la espora por lo que se piensa que pueda tener un papel importante en ese periodo del desarrollo de la bacteria. Kat-A (la catalasa del estado vegetativo) se empieza a transcribir nuevamente hasta 20 minutos después del inicio de la germinación de la espora.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## 6. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, podemos concluir que:

- En el ciclo de vida de *Bacillus cereus* se expresan dos catalasas asociadas con la diferenciación celular: una en la etapa logarítmica y otra en la espora.

- *B. cereus* no excreta sus catalasas al medio de cultivo.

- Las esporas de *B. cereus* presentan dos catalasas en diferentes compartimentos de la misma y con diferentes características bioquímicas:

- La catalasa *spo-teg* se encuentra asociada al exosporio. Esta enzima es la misma que se expresa en el citoplasma de la célula en estado logarítmico y durante el proceso de esporulación. Es una catalasa monofuncional.

- La catalasa *spo-prot* se encuentra en el protoplasma y es una catalasa-peroxidasa.

## 7. REFERENCIAS

- Abrams, J.J. y Webster, D.A., (1990) "Purification, partial characterization and possible role of catalase in the bacterium *Vitreoscilla*" Arch. Biochem. Biophys. 279(1): 54-59.
- Andreoli, A. J., Sulhiro, S., Sakiyama, D., Takemoto, J., Vivanco, E., Lara, J.C. y Klute, M.C., (1973). "Release and recovery of forespore of *Bacillus cereus*". J. Bacteriol. 115:1159-1166.
- Bagyan, Y., Casillas-Martinez, y Setlow, P.,(1998) "The katX gene, which codes for the catalase in spores of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by  $\sigma^F$ , and katX is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. J. Bacteriol. 171: 2646-2652.
- Brophy, P.M. y Barrett, J., (1990) "Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in helminths" Mol. Biochem. Parasitol. 42: 205-212.
- Callahan, H.L., Crouch, R.K. y James, E.R., (1988) "Helminth antioxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants" Parasitol. Today, 4(8):218-225.
- Casillas-Martinez, L. y Setlow, P., (1997) "Alkyl hydroperoxide reductase, catalase mrgA y SOD are not involved in resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat or oxidizing agents" J. Bacteriol. 179(23):7420-7425.
- Chary, P. y Natwig, D.O. (1989). "Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock and development". J. Bacteriol. 171: 2646-2652.
- Davis, B.J., (1964) "Disc electrophoresis II Methods and application to human serum protein". Ann.N.Y. Acad. 121:404-407.
- Doi, R.H., (1969) "Changes in nucleic acids during sporulation". En: The bacterial spore. Vol. 2, Gould, G.W. y Hurst, A. Academic Press, London. p. 125-162.
- Dowds, B. C. (1994) "The oxidative stress response in *Bacillus subtilis*" FEMS Microbiol. Lett. 124: 225-264.
- Ellis, J.K., y Morrison, J.F. (1995) "Buffers of constant ionic strength for studying pH dependent processes. In: Enzyme kinetics and mechanism part C". Methods in Enzymology Vol. 87 pp.405.
- Engelmann, S., Linder, C. y Hecker, M. (1995) "Cloning nucleotide sequence and regulation of Kat E encoding a  $\sigma^B$ -dependent catalase in *Bacillus subtilis*" J. Bacteriol. 177(19):5598-5605.
- Farr, S. B., Touati, D. y Kogoma, T., 1988 "Effects of oxygen stress on membrane functions in *E. coli*: role HPI catalase" J. Bacteriol. 170(4):1837-1842.
- Farr, S.B. y Kogoma, T., (1991) "Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*" Microbiol. Rev. Dec. 561-585.

- Freese, E., (1981) "Initiation of bacterial sporulation". En: sporulation and germination. Levinson H.S., Sonenshein, A.L., Tipper, D.J. (ed) American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Fraaije, M.W., Roubroeks, H.P., Hagen, W.R., y Van Berckell., (1996) Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum* Eur.J.Biochem. 235: 192-198.
- Freese, E. y Heinze, J. (1984) "Metabolic and genetic control of bacterial sporulation" En: The bacterial spore vol. 2 Hurst, A y Goukd, G.W. (eds) Academic Press London p. 102-163
- Fridovich, I. (1998) "Oxygen toxicity: a radical explanation" J. Exp. Biol. 201: 1203-1209.
- Galizzi, A., Albertini, A.M., Baldi, M.L., Ferrari, E. y Zambelli, M.T. (1978) "Genetic studies of spore germination and outgrowth in *Bacillus subtilis*" En: Spores VII. Campbell L. y Halvorson, H.O. (eds.). Amer. Soc. Microbiol., Michigan, U.S.A. pp. 445-483.
- Gjesing W. K., (1991) "Bacterial catalase-peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily". Biochim.Biophys.Acta 1089:215-220.
- Goldberg, I. y Hochman, A., (1989) "Three different types of catalases in *Klebsiella pneumoniae*". Arch. Biochem. Biophys. 268(1): 124-128.
- Goldstein, D.B., (1968) "A method for assay of catalase with the oxygen cathode". Anal. Biochem. 24: 431-437.
- Haliwell, B. y Gutteridge, M.C., (1989) "The chemistry of oxygen radicals and other oxygen derived species" en: Free radicals in Biology and Medicine Ed. Clarendon Press Oxford, 2<sup>a</sup> ed. pp. 22-117.
- Hansberg, W. y Aguirre, J. (1990) "Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen". J. Theor. Biol. 142: 201- 221.
- Hanson, R.S., Srinivasan, V.R. y Halvorson, H.O., (1963) "Biochemistry of sporulation I. Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells". J. Bacteriol. 85: 451-460.
- Harris, H. y Hopkinson, D. A. (1976) "Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics". North Holland Publishing. Amsterdam.
- Hedrick, J.L. y Smith, A.J., (1968) "Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis". Arch. Biochem. Biophys. 126:155-164.
- Heimberger, A. y Eisenstark, A., (1988) "Compartmentalization of catalases in *Escherichia coli*" Biochem. Biophys. Res. Com. 154(1):392-397.
- Hengge-Aronis, R. (1993) Survival of hunger and stress: the role of rpo S in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. Cell 72: 165-168.

- Hillar, A., Van Caesele, L. y Loewen, P.C., (1999) "Intracellular location of catalase-peroxidase hydroperoxidase I of *Escherichia coli*" FEMS Microbiol. Lett. **170**: 307-312.
- Hochman, A. y Goldberg, I., (1991) "Purification and characterization of a catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*" Biochem. Biophys. Acta **1077**:299-307
- Hochman, A. y Shemesh, A. (1987) "Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*" J. Biol. Chem. **262**(14): 6871-76.
- Hochman, A., Figueredo, A. y Wall, J.D., (1992) "Physiological functions of hydroperoxidases in *Rhodobacter capsulatus*" J. Bacteriol. **174**(10): 3386-3391.
- Kenynan, A. y Sandler, N. (1984) "Spore research in historical perspective" En: The bacterial spore vol. 2. Hurst, A y Goukd, G.W. (ed) Academic Press London. p. 2-41
- Klotz, M.G., Klassen, G.R. y Loewen, P.C. (1997) "Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases" Mol. Biol. Evol. **14**(9):951-958.
- Levy, E., Eyal, Z. y Hochman, A., (1992) "Purification and characterization of a catalase peroxidase from the fungus *Septoria tritici*". Arch. Biochem. Biophys. **296**(1):321-327.
- Loewen, P.C., Switala, J. y Triggs-Raine, B.L., (1985) "Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently" Arch. Biochem. Biophys. **248**(1):144-149.
- Loewen, P. C. y Switala, J. (1987<sup>1</sup>) "Multiple catalases in *Bacillus subtilis*". J. Bacteriol. **169**: 3601-3607.
- Loewen, P. C. y Switala, J. (1987<sup>2</sup>) "Purification and characterization of catalase-1 from *Bacillus subtilis*". Biochem. Biophys. Acta **243**: 144-149.
- Loewen, P. C. y Switala, J. (1988) "Purification and characterization of spore specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*". Biochem. Cel. Biol. **66**: 707-714
- Loprasert, S., Negoro, S. Y Okada, H., (1989) "Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus stearothermophilus* peroxidase gene (per A)" J. Bacteriol. **171**(9):4871-4875.
- Lowry, O.H., Rosenborough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., (1951) "Protein measurement with the Folin fenol reagent". J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
- Margoliash, E., Novogrodsky, A. y Schejter, A., (1960) "Irreversible reaction of 3-amino-1,2,4 triazole and related inhibitors with the protein of catalase", J. Biochem. **74**:339-350.
- Markwell, M.A., Hass, S.M., Tolbert, N.E. y Bieber, L.L., (1981) "Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures". Methods Enzymol. **72**: 296-303.

- Matsuda, M., Ishikawa, T., Takeda, T. y Shigeoka, S., (1996), "The catalase-peroxidase of *Synechococcus* PCC7942: purification, nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli*". Biochem. J. **316**:251-257.
- Menéndez, M.C., Ainsa, J.A., Martín, C. y García, M.J. (1997) "Kat GI y Kat GII encode two different catalases-peroxidases in *Mycobacterium fortuitum*" J. Bacteriol. **179** (22): 6880-6886.
- Naclerio, G., Baaccigalupi, C., Caruso, C., De Felice, M. y Ricca E. (1995) "*Bacillus subtilis* vegetative catalase is an extracellular enzyme". Appl. Environ. Microbiol. **61** (12): 4471- 4473.
- Nadler, V., Goldberg, I., y Hochman, A., (1986) "Comparative study of bacterial catalases", Biochim. Biophys. Acta **882**: 234-241.
- Newton, G.L. y Fahey, C. (1990) "Glutathione in prokaryotes" En: Glutathione: Metabolism and physiological functions. Vifia J. (ed.) CRC Press Inc., U.S.A. pp. 69-77.
- Ohyama, K., Kaneko, I., Yamakawa, T. Y Ohkuma, S. (1978) "Valyl-tRNA synthetase of sporulating *Bacillus subtilis*" en: Spores VII Campbell L., y Halvorson, H.O. (eds.). Amer. Soc. Microbiol., Michigan, U.S.A.
- Poole, R. K., (1983) "Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron transfer proteins". Act. Biochem. Biophys. **726**: 205-243.
- Priest, F. G., (1989) " Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria" en: *Bacillus*. Harwood, C. (ed) Plenum Press New York p.23-27.
- Schnell S. y Steinman, (1995), "Function and stationary-phase induction of periplasmic copper zinc superoxide dismutase and catalase-peroxidase in *Caulobacter crescentus*" J. Bacteriol. **177**(20): 5924-5929.
- Sellow, P., (1981) "Biochemistry of bacterial forespore, development and spore germination" en: Sporulation and germination. Levinson, H., Sonenshein, A.L. y Tipper, D.J., (eds.) American Society of Microbiology p.13-28.
- Stragier, P. y Losick, R., (1996) "Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*". Annu. Rev. Genet. **30**: 297-341.
- Völker, U., Mach, H., Schmid, R. Y Hecker, M. (1992) "Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*" J. Gen. Microbiol. **138**(10):2125-2135.
- Von Ossowski, Y., Mulvey, M. R., Leco, P.A., Borys, A. y Loewen, P.C. (1991) "Nucleotide sequence of *Escherichia coli* Kat E, which encodes catalase HPII". J. Bacteriol. **173**: 514-520.
- Yumoto, I., Fukumori, Y. y Yamanaka, T., (1990) "Purification and characterization of catalase from a facultative alkalophilic *Bacillus*" J. Biochem. **108**(4):583-587.