

124
2 ej^o



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESION DE ISOENZIMAS DE CATALASA
DURANTE EL CICLO DE VIDA DE
BACILLUS CEREUS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
SHADAY MICHÁN AGUIRRE



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Expresión de isoenzimas de catalasa durante el ciclo de
vida de Bacillus cereus."
realizado por Shaday Michán Aguirre

con número de cuenta 8831397-1 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Dr. José Edgardo Escamilla Marván
Director de Tesis

Propietario

Dr. Wilhelm Hansberg Torres
Propietario

Dr. Jesús Manuel León Cázares
Propietario

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Suplente

Dra. Patricia Guevara Fefer.
Suplente

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINACIÓN GENERAL
DE BIOLOGÍA

A mis padres **Judith y Ramón**, porque hemos vivido juntos todos los momentos, por ser buenos consejeros y amigos.

A **Layla** mi gran amiga, colega y hermana y por el cariño tan grande que le tengo.

A mi abuelita **Cecl** porque ha sido un gran apoyo en momentos especiales.

A mi abuelita **Esther** por su ejemplo de disciplina.

A mi tía **Pimpo** por su cariño y comprensión.

A mis tíos y primos porque siempre los tengo presentes.

A mis amigos por su amistad y cariño.

A todos los profesores que han participado en mi formación académica, sin ellos no hubiera llegado hasta aquí.

Doy las gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la gran oportunidad de desarrollarme académicamente en ella.

Agradezco a Fundación UNAM la beca otorgada durante la realización de este trabajo.

Doy especialmente las gracias al Dr. Edgardo Escamilla por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por dirigir esta tesis, por contar con su apoyo y por introducirme al área experimental participando de manera importante en mi formación académica.

Agradezco sinceramente al Dr. Wilhelm Hansberg porque su participación fue determinante para que esta tesis llegara a concretizarse, por el tiempo empleado para revisar cuidadosamente este trabajo y por la ayuda que recibí de su parte en todo momento que necesité.

Porque ha sido participe con sus orientaciones, enseñanzas y consejos de mi desarrollo académico y motivó mi interés hacia el área de investigación, además de participar con su revisión en el mejoramiento de este trabajo, gracias Dr. Jesús Manuel León Cázares.

Expreso mi agradecimiento al Dr. Alejandro Fernández por la revisión y consejos que me dio para mejorar el fondo y estilo de la tesis.

Agradezco a la Dra. Patricia Guevara por leer este trabajo y dar sus observaciones.

El desarrollo de esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda que recibí durante mi estancia en el laboratorio 101 Ote. del Instituto de Fisiología Celular, por parte de las siguientes personas: **Martha, Rafael, Héctor, Fernando, Miguel Angel, Enrique y Juanito**, a las cuales les doy las gracias por sus consejos, orientaciones y la tolerancia que me tuvieron durante el trabajo experimental que realicé.

Doy las gracias a **Pablo** y a **Fer** por contar con ellos como buenos vecinos de trabajo y por el apoyo que me brindaron principalmente para finalizar la tesis.

A **Oli**, gracias por tu amistad y por estar conmigo desde mis inicios experimentales.

Por la ayuda que siempre recibí de tu parte, gracias **Elizabeth**.

INDICE

Introducción	1
-Diferenciación celular.....	1
-El ciclo de vida de <i>Bacillus cereus</i> como modelo de diferenciación celular.....	2
-Ciclo de vida de <i>Bacillus cereus</i>	3
-Etapas <i>lag</i> y <i>log</i>	3
-Esporulación.....	5
-Espora libre.....	8
-Germinación.....	10
-Especies de oxígeno reactivas y sistemas biológicos.....	11
-Producción de EROS en sistemas biológicos y su toxicidad.....	14
-Mecanismos de transformación de las EROS en los sistemas biológicos.....	15
-Estrés oxidativo y daños producidos por las EROS en los sistemas biológicos.....	16
-Diferenciación celular y estrés oxidativo.....	17
-Características bioquímicas de la catalasa.....	19
-Expresión diferencial de las isoenzimas de catalasa en algunos procesos de diferenciación.....	20
-Catalasas en <i>Bacillus</i>	22
Hipótesis	24
Objetivos	24
Materiales y Métodos	25
-Obtención de muestras de <i>Bacillus cereus</i> en crecimiento logarítmico, en diferentes tiempos del proceso de esporulación y en esporas libres	25
-Obtención de las células germinadas.....	27
-Ruptura de las células.....	28
-Separación de los compartimentos del esporangio.....	29
-Determinación de la cantidad de proteína.....	29
-Determinación de la actividad específica y total de catalasa.....	30
-Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	31

-Determinación de las isoenzimas de catalasa por medio de zimogramas.....	32
Resultados.....	33
-Isoenzimas y variación de la actividad específica de catalasa en la etapa de crecimiento logarítmico y durante el proceso de esporulación de <i>Bacillus cereus</i>	33
-Expresión diferencial de las isoenzimas de catalasa en los compartimentos del esporangio de <i>Bacillus cereus</i>	37
-Isoenzimas de catalasa en las esporas libres de <i>Bacillus cereus</i>	38
-Isoenzimas y variación de la actividad específica de catalasa durante la germinación de <i>Bacillus cereus</i>	39
Discusión.....	42
-Causa de las variaciones en la actividad específica de la catalasa durante la esporulación de <i>Bacillus cereus</i> , isoenzimas presentes y su posible relación con un estado de tensión oxidativa.....	42
-Heterogeneidad de las bandas de catalasa al separar los compartimentos del esporangio, en la germinación y al aislar las catalasas de esporas de <i>Bacillus cereus</i>	44
-Diferencia en movilidad de las catalasas de <i>Bacillus cereus</i> y la catalasa de hígado de bovino.....	46
Conclusiones.....	47
Perspectivas del trabajo.....	48
Bibliografía.....	49

INTRODUCCION

Diferenciación celular

El estudio de la célula como constituyente esencial de los sistemas biológicos, nos ha permitido conocer una gama de procesos sorprendentes que en ella se llevan a cabo. Uno de tales procesos es la diferenciación celular.

La diferenciación celular incluye una serie de transformaciones que sufren las células para realizar una función especializada.

Los mecanismos de diferenciación se presentan en la mayoría de los organismos. Son fundamentales en las primeras etapas del desarrollo embrionario y también, son esenciales para la sobrevivencia de seres unicelulares como las bacterias.

La variedad de los distintos procesos de diferenciación celular que existen en los organismos vivos es enorme.

Aunque se conocen algunos aspectos de como se lleva a cabo la diferenciación celular en microorganismos, todavía no se logra describir en detalle el mecanismo del proceso que conduce a que los sistemas biológicos se diferencien.

El tratar de saber más a cerca de la diversidad y naturaleza de los procesos de diferenciación celular como fenómeno biológico, es causa de que se realicen varias investigaciones en esta área de la ciencia.

Llevar a cabo estudios de diferenciación celular en microorganismos resulta menos complicado que en otros sistemas biológicos, ya que el proceso puede inducirse fácilmente, es relativamente rápido y generalmente se prestan para su manipulación fisiológica y genética.

Los modelos experimentales con los que más se ha trabajado para realizar estudios de diferenciación son bacterias como *Bacillus* y *Clostridium*, hongos como *Aspergillus* y *Neurospora* y protoctistas del género *Dictyostelium* y *Volvox*.

El ciclo de vida de *Bacillus cereus* como modelo de diferenciación celular

La endospora bacteriana fue descrita de manera simultánea en 1876 por Ferdinand Cohn y Robert Koch (Brock, 1961). A partir de entonces ha sido motivo de un gran interés el estudio de sus propiedades, así como del desarrollo de los fenómenos previos a su formación y germinación.

La formación de esporas se da en varios grupos de bacterias, tanto en las Gram⁺ como Gram⁻. Entre las Gram⁺ la espora es llamada endospora porque se desarrolla dentro de la célula madre. En las etapas tempranas de la esporulación se presenta división celular asimétrica que da lugar a una célula pequeña que llegará a ser la espora y que persistirá y una célula más grande, la célula madre que eventualmente desaparecerá al lisarse (Dworkin, 1985).

Son numerosas las bacterias Gram⁺ que generan endosporas, como parte de este grupo se encuentra el género *Bacillus* que ha recibido la mayor atención. Estos son organismos con forma de bastón, de 2 a 7 μm de longitud y 0.3 a 1.2 μm de diámetro. Generalmente presentan movilidad por flagelos peritricosos (Claus y Fritze, 1989). Todos son aeróbios quimiótrofos y se pueden encontrar en el aire, agua y suelo (Harwood, 1989). Algunas especies como *Bacillus subtilis* o *Bacillus megaterium*, pueden crecer en un medio simple que contiene únicamente glucosa y pocas sales, mientras que otros tienen requerimientos extremadamente complejos o bien los hay que no pueden ser cultivados en un medio artificial (Dworkin, 1985).

Desde 1950 la esporulación bacteriana en *Bacillus* se ha utilizado como un sistema modelo para analizar los procesos de diferenciación en organismos procariotas (Doi, 1989). El género *Bacillus* presenta un ciclo de vida corto, del que se tiene un conocimiento detallado, es de fácil manipulación, es posible trabajar con una etapa determinada de desarrollo y permite aislar a la endospora de la célula madre y estudiar los compartimentos durante la esporulación (Andreoli *et al*, 1973).

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 los factores que determinan las propiedades de las esporas se han obtenido de algunos representantes del

mismo género, en las cuales dichos procesos y factores son similares (Setlow, 1981). Los *Bacillus* más estudiados son *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* y *B. cereus*.

Ciclo de vida de *Bacillus cereus*

Etapas lag y log

Un cultivo de *Bacillus* monitoreado a partir de un inóculo de bacterias en crecimiento logarítmico presenta diferentes etapas (Fig. 1). La primera de ellas es la etapa denominada lag, que corresponde al acondicionamiento de las células al medio. No hay crecimiento bacteriano. Posteriormente, debido a la abundancia de nutrientes la población crece en forma exponencial (Fig. 1, ciclo a). A esta etapa se le denomina logarítmica (log) y se caracteriza porque las bacterias presentan una movilidad mínima y se organizan en cadenas, para formar filamentos largos. En el caso de *B. subtilis* se registra un ritmo de crecimiento de 30 minutos por generación si el medio en que crece es complejo y cerca de 45 minutos si es un medio mínimo de glucosa y sales (Dworkin, 1985).

A lo largo de la fase lag se encuentran reprimidos los genes que codifican para la síntesis de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC). De tal forma que cuando *Bacillus* crece en un medio con glucosa, hay una acumulación de piruvato y acetato lo que provoca que el pH alcance valores entre 5 y 6 (Hanson *et al*, 1963).

La disminución de nutrientes en el medio es una condición desfavorable para el crecimiento del cultivo y provoca que las células desarrollen una serie de respuestas que les evitan la inanición y las capacitan para que resistan por periodos largos sin nutrientes (Freese, 1981), (Fig. 1, ciclo b).

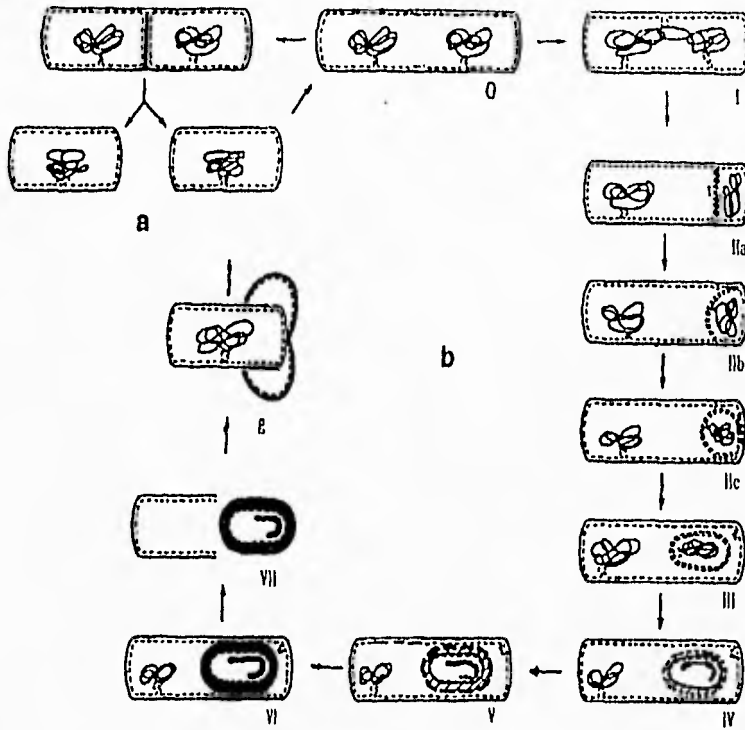


Figura 1. Ciclo de vida de *Bacillus cereus*. *Bacillus* en etapa vegetativa tiene la capacidad de crecer y dividirse en dos células, de esta forma el tamaño de la población aumenta logarítmicamente (ciclo a de la figura). Este crecimiento se mantiene si las condiciones de nutrimentos en el medio son óptimas; de lo contrario, las bacterias entran al proceso de esporulación (ciclo b de la figura).

Se detiene su reproducción (0) y se dan una serie de cambios bioquímicos previos a la esporulación. El DNA se organiza en un filamento axial (I) y se condensa asimétricamente, con ésto se facilita la septación en uno de los polos (IIa). El septo se autolisa y la célula madre prolonga su citoplasma para envolver a la preespora (IIb y c). La endospora se encuentra dentro de la célula madre y crece (III). Comienza a formarse la corteza (IV), la cubierta (V) y se completan los tegumentos que recubren a la espora (VI). Al final la célula madre se lisa y deja en libertad a la espora (VII). Esta última, si encuentra las condiciones adecuadas, germina (g) y así de completa el ciclo. Modificado de Freese y Helnze, 1983.

Esporulación

En esta etapa la bacteria inicia una secuencia de procesos que dan como resultado la formación de una spora. La fase de esporulación puede ser considerada como la última opción que tiene la célula de responder a la privación de nutrientes (Doi, 1989).

El proceso completo generalmente dura de 6 a 8 h bajo condiciones de crecimiento en el laboratorio. Para su estudio el proceso de esporulación se ha dividido en siete etapas basadas en los cambios citológicos que se dan durante la formación de la spora (Fig. 1b). Cada fase de desarrollo ocurre en un tiempo determinado, así la etapa IV tendrá cerca de la cuarta hora (*t₄*) a partir de que se inició el proceso de esporulación.

Etapa 0, *t₀* o estacionaria: se da al final de la fase de crecimiento logarítmico, aproximadamente a los 30 minutos después de que el cultivo alcanza el pH mínimo (Freese y Hainze, 1983). El crecimiento de la población se detiene y se empiezan a dar los primeros cambios fisiológicos que desencadenan el proceso de esporulación (Doi, 1989). Uno de ellos es la síntesis de flagelos que les permite a los *Bacillus* buscar los escasos nutrientes que todavía se encuentran en el medio y responder quimiotácticamente a ellos. La mayoría de las cadenas de bacterias desaparecen al aumentar la capacidad de movimiento de las células (Fig. 2).

Así mismo en esta etapa se induce la activación de los genes que codifican para la síntesis de algunas enzimas intracelulares, como las que participan en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, y otras extracelulares, por ejemplo, proteasas, nucleasas, amilasas, fosfatasas y otras enzimas hidrolíticas (Priest, 1989). Esto permite que las células obtengan energía a partir de otras fuentes de carbono, como los ácidos orgánicos presentes en el medio. Producto del consumo de tales ácidos el pH del cultivo aumenta hasta alcanzar valores cercanos a 7 (Sharp, 1989). Al mismo tiempo las enzimas extracelulares actúan sobre polímeros y sustratos que se encuentran en su microambiente para proporcionar a la célula monómeros metabolizables como nutrientes (Doi, 1989).

Si la fuente de alimento obtenida de esta manera no es suficiente las bacterias estarán destinadas a seguir el curso de la esporulación.

Etapa I o *t1*: el DNA se organiza en forma de un filamento axial a lo largo de la célula lo que afecta al proceso de tabicación simétrica característico del crecimiento vegetativo de las bacterias (Lutkenhaus, 1994).

Etapa II o *t2*: al llegar el cultivo a esta fase, ya no es capaz de revertir a la etapa de crecimiento logarfmico aunque se le adicionen nutrientes al medio. En *t2* una copia de todo el DNA de las bacterias se condensa asimétricamente en uno de los polos y se permite así la formación de un septo asimétrico que divide a la célula en una porción pequeña, que originará la preespora y una más grande, correspondiente a la célula madre (Piggot 1994). El septo desaparece por autólisis y como resultado se presentan dos compartimentos independientes delimitados cada uno por una membrana plasmática. La célula madre prolonga su citoplasma y con éste envuelve el cuerpo de la preespora.

Etapa III o *t3*: la célula madre cubre completamente a la preespora y de esta manera la lleva a residir en el interior de su citoplasma y a adquirir una membrana adicional con polaridad invertida (Freese y Heinze, 1983).

Etapa IV o *t4*: se inicia la formación de la corteza entre la membrana interna y externa de la endospora, lo que influye en que se de la refractabilidad (Fig. 2).

Etapa V o *t5*: se depositan las proteínas que formarán la cubierta sobre la membrana externa de la endospora.

Durante las etapas posteriores se refuerzan las capas de la endospora hasta completar su maduración y capacitarse para resistir las condiciones adversas que el medio le imponga cuando la célula madre se destruya (Doi, 1989).

La esporulación es más eficiente y sincrónica cuando las células han crecido en un medio rico en nutrientes, por un mínimo de seis a siete generaciones antes de que comience el proceso.

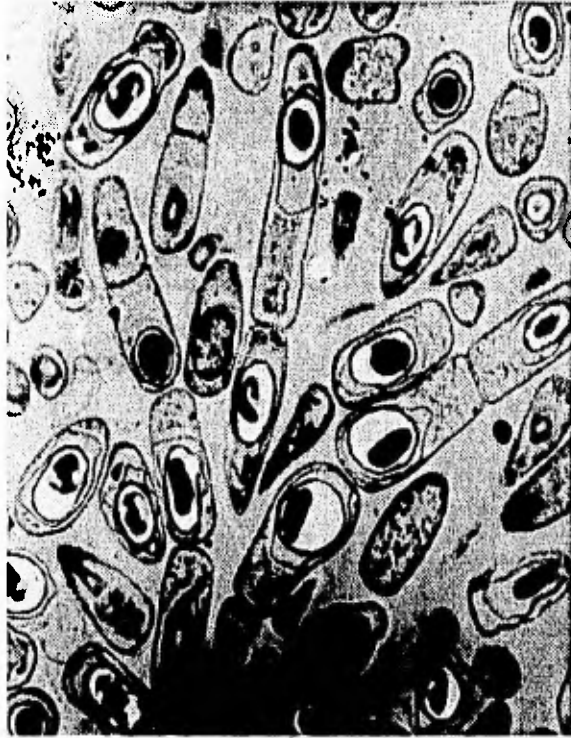


Figura 2. Fotografía de *Bacillus cereus* en diferentes etapas de esporulación. Microscopía electrónica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Espora libre

La espora libre es una célula resistente a las condiciones extremas del medio y se encuentra en un estado de mínima actividad metabólica.

El citoplasma de la espora contiene enzimas solubles, metabolitos, ácidos nucleicos y se caracteriza por tener concentraciones extremadamente altas de Ca^{++} (1 a 3% del peso seco de la espora) y de ácido dipicolínico (10 % del peso seco de la espora), más proteínas de bajo peso molecular que representan del 40 a 50 % del total de proteínas presentes en el citoplasma (Gould, 1983).

La primera capa que delimita al citoplasma es la membrana interna de la espora. Inmediatamente hacia afuera de ésta se encuentra la pared de la célula germinal, que consiste de peptidoglicanos y que dará origen a la pared celular de la bacteria (Archibald, 1989). Sigue la corteza, que está constituida también por peptidoglicanos modificados, que contiene aproximadamente un 55% de unidades de lactama del ácido murámico (Dworkin, 1985), (Fig. 3).

Luego se presenta la membrana externa de la espora, que tiene polaridad inversa a la de la célula madre.

La siguiente capa, es la cubierta. Se divide en interna y externa, consiste principalmente de polipéptidos con un peso molecular de alrededor de 13 kDa (Hanson, 1979)

Por último está el exosporio, que en *B. cereus* es una capa delgada compuesta químicamente de proteínas, polisacáridos, lípidos neutros y fosfolípidos (Matz *et al*, 1970), (Fig. 4). La parte proteica de esta capa tiene un bajo contenido en cisteína a diferencia de la parte externa de la cubierta que es rica en ese aminoácido. Las proteínas del exosporio son altamente resistentes a la actividad de las enzimas proteolíticas.

La espora libre tiene la capacidad de permanecer en latencia durante un tiempo indefinido. Pero si las condiciones del medio son favorables al crecimiento, la espora germinará.

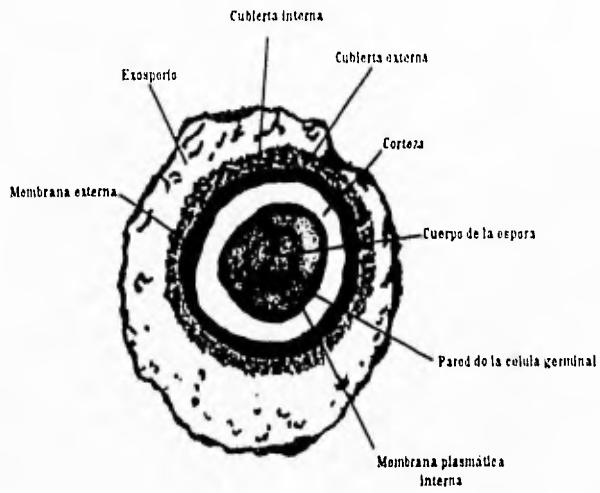


Figura 3. Esquema de una espora de *Bacillus cereus*.

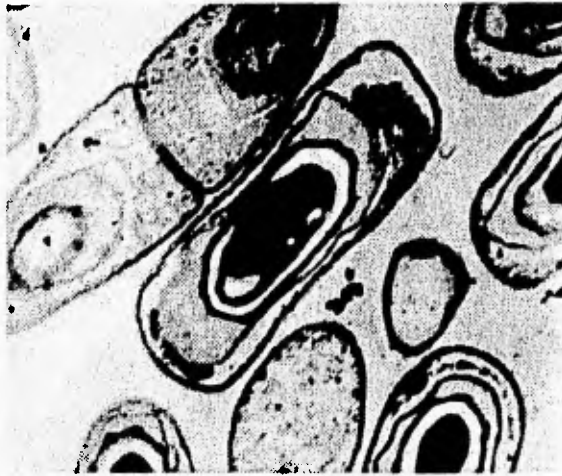


Figura 4. Fotografía de una espora en el interior de la célula madre. Microscopía electrónica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Germinación

La germinación es el proceso a partir del cual una espora se transforma en una célula vegetativa. Convencionalmente la germinación se ha dividido en tres etapas: 1) activación, 2) iniciación o germinación y 3) expansión (Setlow, 1983).

En la activación la espora sufre ciertos cambios que facilitan la respuesta de la célula hacia las condiciones del medio favorables para germinar. Este proceso reversible se produce por tratamiento con calor, detergentes, radiación ionizante, exposición a pH bajos o agentes reductores (Keinan *et al*, 1964). Las esporas que han sido almacenadas durante un tiempo prolongado no necesitan ser activadas para germinar (Dworkin, 1985).

La iniciación ó germinación es un proceso irreversible que incluye la conversión de una espora activada a una célula que ha perdido las propiedades fisiológicas características de la célula en estado latente.

La germinación se puede inducir por diversos tratamientos como la exposición a nutrientes, enzimas, diversas sustancias y factores físicos. La variación en los agentes específicos que desencadenan la germinación en las diferentes especies de esporas activadas es muy grande. Por ejemplo se pueden mencionar: azúcares (glucosa, fructosa), aminoácidos (alanina, leucina, prolina), purinas (adenosina), enzimas hidrolíticas (lisozima), sales (calcio-ácido dipicolínico, bromuro de potasio), detergentes (dodecilamina), presiones elevadas y abrasión, entre otras (Setlow, 1981).

Un solo compuesto como L-alanina, ribosa o glucosa son suficientes para una germinación óptima en muchas especies. Sin embargo, las esporas de otras especies requieren de mezclas de los germinantes para una rápida y completa iniciación de la germinación.

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

Una vez expuestas a los germinantes, las esporas activadas pierden la capacidad de resistir el calor, excretan el calcio y el ácido dipicolínico almacenados (Scott y Ellar,

1978). Posteriormente se degradan los peptidoglicanos de la corteza lo que posiblemente conduce a la pérdida de la refringencia (Hashimoto *et al*, 1969), así como de la resistencia a radiaciones UV. Todos estos efectos se producen rápidamente, a los cinco minutos de haber agregado los germinantes (Setlow, 1981). La degradación de los peptidoglicanos, lípidos, RNA y proteínas ocurre también durante los primeros minutos y se prolonga durante todo el proceso (Setlow, 1983). Posteriormente entra agua a la célula y se hincha, el metabolismo se activa por inicio de la respiración y hay acumulación de compuestos de alta energía.

La última etapa con la que se completa el ciclo de vida es la expansión. Se forma la pared celular y se inicia la síntesis del DNA. Con ello comienza nuevamente el crecimiento logarítmico.

Especies de oxígeno reactivas y sistemas biológicos

El dioxígeno (O_2) es esencial para el mantenimiento de la vida en los organismos aerobios y su ausencia produce la muerte de los mismos. Sin embargo, para las células el dioxígeno resulta altamente tóxico, debido a la producción exagerada de especies reactivas como el oxígeno en "singlet", el peróxido de hidrógeno y los radicales superóxido e hidroxilo.

La molécula de dioxígeno puede ser considerada como un birradical debido a los dos electrones desapareados que se encuentran en sus últimos orbitales (Farr y Kogoma, 1991) (Fig. 6). La disposición paralela que presentan dichos electrones confiere al O_2 menor habilidad de aceptar un par de electrones de otra molécula en la que estos se encuentran antiparalelos. Así la reducción del oxígeno se retarda por la aceptación de electrones de uno en uno y genera especies de oxígeno reactivas (EROS) como se observa en la figura 5 (Halliwell y Gutteridge, 1989).

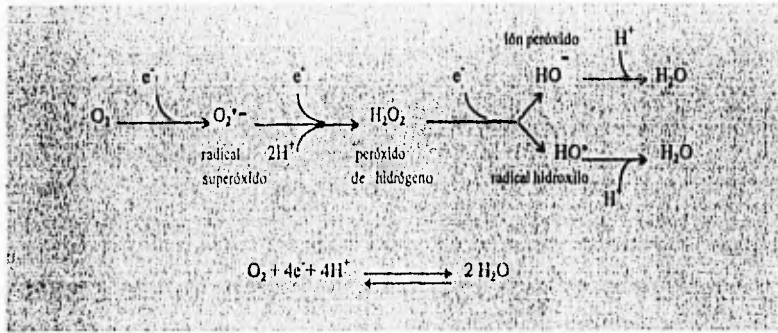


Figura 5. Especies de oxígeno reactivas que se forman al reducirse el dióxígeno

El O_2 puede también aumentar su reactividad si uno de los electrones solitarios absorbe energía e invierte su rotación generando así una especie reactiva conocida como oxígeno en "singlet" o singulete (Fig. 6)

Existen dos tipos de oxígeno singulete, el sigma (Σ) que tiene electrones desapareados debido a lo cual es un radical libre a diferencia del delta (Δ) que tiene todos sus electrones formando pares y no es un radical (Fig.6). El singulete sigma presenta una vida media corta y decae en la forma delta (Δ) o en el estado basal $^3\text{O}_2$, debido a esto la especie Δ juega un papel importante en los organismos.

El radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) no es muy reactivo, sin embargo, es potencialmente dañino debido a la capacidad que tiene indirectamente de originar especies como el

radical hidroxilo (HO•). El $O_2^{\bullet-}$ al dismutar produce H_2O_2 y éste último puede generar HO•.

El H_2O_2 no es un radical libre sin embargo es una especie reactiva de oxígeno con capacidad oxidante débil. Difunde y cruza membranas fácilmente y tiene la capacidad de reaccionar con el Fe^{2+} y Cu^+ formando radicales hidroxilo. Fenton en 1894 describió la reacción:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO\cdot + OH^-$$

El H_2O_2 también puede sufrir fisión homolítica por acción de radiaciones ionizantes, calor u otro tipo de energía y originar HO•

El HO• es la más tóxica de las EROS. Es un radical libre que reacciona a una velocidad muy alta con casi todas las moléculas que forman a los organismos.

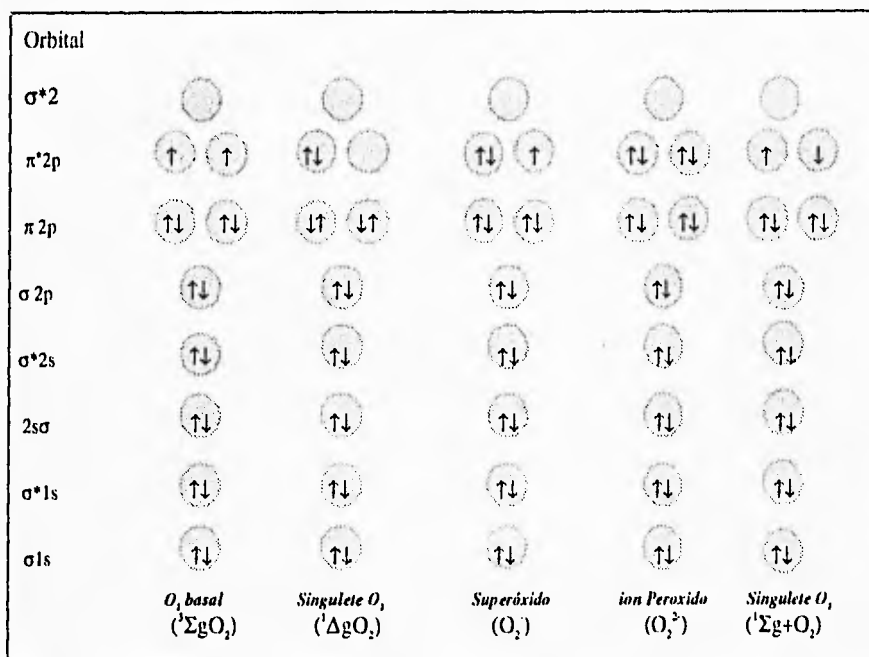


Figura 6. Estructura electrónica de las especies reactivas generadas a partir de la molécula de dióxígeno (Hallwell y Gutteridge, 1989).

Producción de EROS en los sistemas biológicos

Las EROS son producidas en los seres vivos como resultado del metabolismo.

En la formación del oxígeno singlete en los sistemas vivos participan moléculas como pigmentos de la retina, clorofila a y b, riboflavina y sus derivados FMN y FAD, bilirrubina y porfirinas. Estas moléculas son capaces de absorber la luz de cierta longitud de onda, lo que provoca la excitación de sus electrones periféricos, la energía así obtenida puede ser transmitida a moléculas de dióxígeno vecinas lo que produce el cambio de giro de uno de sus electrones y origina el singlete.

La formación del radical superóxido *in vivo* también se da por la acción de diversas enzimas como la xantina oxidasa, la aldehído oxidasa, la galactosa oxidasa, la indolamina oxigenasa y la nitropropano dioxigenasa entre otras (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Probablemente la fuente más importante de producción de $O_2^{\bullet-}$ en la mayoría de las células aerobias es la cadena de transporte de electrones. A través de ella, son acarreados cuatro electrones al complejo citocromo oxidasa para reducir una molécula de dióxígeno a dos de agua.

Durante el transporte en algunos elementos de la cadena, principalmente en los complejos NADH-coenzima Q reductasa y en las dos formas reducidas de la coenzima Q se produce una fuga de electrones (autooxidación de semiquinonas), que reducen univalentemente al dióxígeno y originan al superóxido. Asociadas a este mecanismo se encuentran enzimas que degradan el $O_2^{\bullet-}$ y producen H_2O_2 y O_2 .

La fuente principal de producción del H_2O_2 es la dismutación del radical superóxido, reacción intracelular catalizada por la superóxido dismutasa. La reducción divalente del dióxígeno para formar peróxido de hidrógeno ocurre en los peroxisomas, orgánulos celulares especializados que tiene enzimas del tipo de las peroxidasas, oxidasas y la catalasa. También se forma el H_2O_2 por la acción de enzimas como la glicolato oxidasa, D y L-aminoácido oxidasa y urato oxidasa durante la β -oxidación de los ácidos grasos de cadenas largas, en la síntesis del colesterol y de las purinas, en el catabolismo de los aminoácidos, el metabolismo del glicolato, la fotorrespiración en las

plantas, la fagocitosis y la fotosíntesis. Igual que el $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 es producido por reacciones fotoquímicas del agua.

Mecanismos de transformación de las EROS en los sistemas biológicos

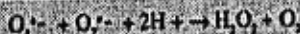
Las células presentan mecanismos que les permiten contrarrestar los daños producidos por las EROS. Los principales mecanismos de defensa antioxidante son:

1) Barreras fisiológicas que confrontan el paso de dioxígeno ambiental al interior las células.

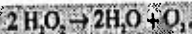
2) Enzimas antioxidantes específicas que se encargan de destruir rápidamente las EROS como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa.

Las superóxido dismutasas (SOD) se presentan en casi todos los organismos.

La reacción de dismutación que la SOD lleva a cabo es la siguiente:



El H_2O_2 es eliminado con la participación de dos tipos de enzimas, las catalasas, que reaccionan de la siguiente manera



y peroxidasas, que actúan según la siguiente reacción:



El HO^{\bullet} reacciona tan rápido que es prácticamente imposible que exista una enzima que lo metabolice, de ahí la importancia de los mecanismos que previenen su formación tales como el eliminar el $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 , el evitar que haya hierro y cobre libres y el acumular compuestos antioxidantes.

3) La vitamina E (α y β - tocoferoles), la vitamina C (ácido ascórbico), los carotenos (β -caroteno, cantaxantina, luteína, licopeno), el glutatión, los ubiquinoles, la bilirrubina y el urato, entre otros presentan actividad antioxidante en las células.

Estrés oxidativo y daños producidos por las EROS en los sistemas biológicos.

Cuando se produce un desbalance entre la formación de las EROS y la capacidad de las células para neutralizarlos mediante las defensas antioxidantes, se genera un aumento en la concentración basal de las EROS lo que se define como estrés oxidativo o estado hiperoxidante.

La sobreproducción de EROS puede causar graves daños celulares, que dependerán del tipo de especie que se presente. El HO^\bullet es el principal agente que afecta a las células, reacciona con las lecitinas de las membranas desencadenando la lipoperoxidación. También ataca azúcares como la desoxirribosa que forma parte del DNA, produciendo una gran variedad de productos mutagénicos. Interacciona con los anillos aromáticos de las bases púricas y pirimídicas del DNA y RNA. Esto conduce a que la síntesis, estructura y función de las proteínas se vea alterada, así como también la actividad de las enzimas que participan en los procesos metabólicos. Además el HO^\bullet reacciona con cualquier molécula vecina y genera diversos radicales de reactividad variable.

El H_2O_2 puede oxidar grupos tioles, piruvato, cetoácidos e incluso algunas proteínas. La gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa que es una enzima que participa en la vía glucolítica es inhibida por H_2O_2 . Grandes dosis de peróxido de hidrógeno afectan la síntesis de ATP por inhibición de la glucólisis.

El $\text{O}_2^{\bullet-}$ en solución acuosa es un débil agente oxidante de ácido ascórbico, catecol y α -tocoferoles. Puede oxidar lentamente grupos tioles presentes en aminoácidos que forman a las proteínas.

El oxígeno en "singlet" difunde a corta distancia y puede atacar moléculas fotosensibles como algunas hemoproteínas, porfirinas y flavin-proteínas.

Diferenciación celular y estrés oxidativo

Actualmente se plantea que la diferenciación celular se da como consecuencia de la expresión secuencial de ciertos genes que en la célula indiferenciada se encontraban apagados. Sin embargo falta por determinar la serie en la que se activan los genes, es decir el programa de expresión génica y los fenómenos que desencadenan la activación del mismo.

En respuesta al último punto Hansberg y Aguirre (1990) elaboraron la "teoría de la evasión del dioxígeno" que pretende de modo general explicar la diferenciación celular microbiana.

La "teoría de la evasión del dioxígeno" propone que las transiciones entre los estados fisiológicos estables se dan a través de un estado hiperoxidante.

Los estados estables se mantienen al evitar que aumente la concentración intracelular de especies reactivas del oxígeno. Para ello la célula debe mantener un equilibrio entre la cantidad de acarreadores de electrones en estado reducido (poder reductor XH) y la concentración intracelular de dioxígeno. El estado hiperoxidante se genera cuando se rompe este equilibrio debido a factores como:

- 1) un aumento súbito en la entrada de dioxígeno ambiental;
- 2) una disminución brusca en la entrada de dioxígeno;
- 3) la inhibición de la cadena respiratoria;
- 4) la disminución del poder reductor por falta de nutrientes o por la presencia de sustancias oxidantes;
- 5) un incremento de las especies reactivas de oxígeno provenientes del metabolismo celular, por efecto de radiaciones, particularmente de luz azul y ultravioleta;
- 6) la falta de mecanismos antioxidantes eficientes;
- 7) un incremento de las especies reactivas de oxígeno provenientes del exterior.

El estado hiperoxidante aunque se genera en condiciones fisiológicas, es un estado inestable que dura pocos minutos durante los cuales la célula no puede crecer.

Para compensar el estado hiperoxidante la célula debe aumentar su capacidad para reducir al dioxígeno, o bien disminuir la entrada del mismo. Cuando sucede lo primero, la célula regresa a su estado estable anterior, esto es, la célula se ha adaptado a

condiciones más oxidantes. Cuando reacciona evadiendo rápidamente el dióxígeno, la célula alcanza un estado estable diferente, producto del cambio de la organización morfológica y funcional de la célula debido a la oxidación masiva de los componentes celulares; en este caso lo que ha ocurrido es un proceso de diferenciación celular. Si no puede compensar rápidamente el estado hiperoxidante, la célula muere.

Para recuperar la estabilidad y mantenerla, la célula tiene que ajustar su capacidad de reducir al dióxígeno, de generar poder reductor y sus mecanismos antioxidantes (Fig. 1).

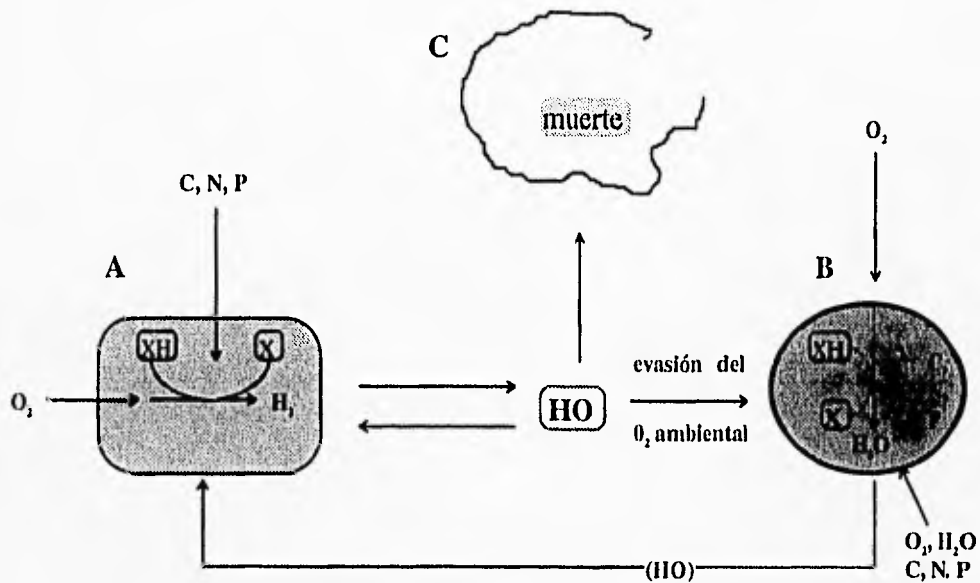


Figura 6. Diagrama del ciclo de vida de un microorganismo de acuerdo a la teoría de Hansberg y Aguirre 1990. Los símbolos: C, N, P fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo; XH , acarreadores de electrones reducidos; X , acarreadores de electrones oxidados; HO , estado hiperoxidante; (HO) , posible estado hiperoxidante.

Si tomamos en cuenta la hipótesis de Hansberg y Aguirre (1990), podemos plantear que la tensión oxidativa generada por la falta de nutrimentos posiblemente influya en el proceso de diferenciación celular bacteriana, al determinar la transición entre el estado estable de crecimiento y el de la espora. Además, la actividad de la catalasa como un eficiente mecanismo antioxidante con que cuentan las células, se verá modificada a lo largo del proceso de la diferenciación bacteriana, al ajustar su capacidad catalítica para contrarrestar eficientemente las diferentes condiciones de tensión oxidativa que se desarrollen intracelularmente.

Características bioquímicas de la catalasa

La catalasa es una hemoproteína que se encuentra en la mayoría de las células aerobias, desde mamíferos, plantas, hasta microorganismos (Deisseroth y Dounce, 1970); con excepciones como en *Bacillus popilliae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Euglena sp.*, *Gleocapsa sp.* y varios parásitos helmintos. Algunos anaerobios estrictos como *Propionibacterium shermanii*, *Acetobacter peroxidans* y *Shigella dysenteriae* sí presentan catalasa (Halliwell y Gutteridge, 1989).

El origen de esta enzima se remonta probablemente a hace 2 mil millones de años, cuando la atmósfera cambió de reductora a oxidante. A partir de entonces, los sistemas biológicos que desarrollaron mecanismos para neutralizar los efectos tóxicos de las EROS, generadas al participar el oxígeno en la cadena transportadora de electrones, experimentaron una mayor adaptabilidad y proliferaron en el medio (Ossowski *et al.*, 1983).

Las catalasas son un grupo de proteínas altamente conservadas. La forma más común, tanto en eucariotes, como en procariotes es una hemoproteína tetramérica de subunidades idénticas de 60 kDa. Como grupo prostético cada monómero tiene unido un protohemo IX (Sharma *et al.*, 1989)

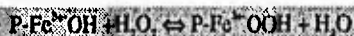
Algunas excepciones a lo anterior se presentan en *Escherichia coli* (Lowen y Switala, 1986; Chui *et al.*, 1989) y *Bacillus subtilis* (Loewen y Switala, 1987², 1988), sus

catalasas son hexaméricas además de presentar un hemo d-isómero en lugar de un protohemo una de sus isoenzimas. Esto último también sucede en *Neurospora crassa* (Jacob y Orme-Johnson, 1979). Las catalasas de *Escherichia coli* tienen subunidades de mayor tamaño (Clairborne y Fridovich, 1974; Loewen y Switala, 1986). *Lactobacillus plantarum* (Kono y Fridovich, 1983) y *Thermotophilum album* (Algood y Perry, 1986) tienen como cofactor manganeso en lugar de hierro. Este es un grupo de catalasas diferente, sin hemo.

La estructura de la catalasa del hígado de bovino y la de *Penicillium vitale* (Sharma, 1989) se ha determinado a una resolución de 2.5 Å y 2.0 Å respectivamente

Las catalasas en general son inhibidas por azida, cianuro y 3 amino-1, 2, 4 triazol.

El mecanismo de reacción de la catalasa ocurre en dos pasos. El primero conlleva a la formación de un complejo primario entre el peróxido de hidrógeno y el hierro que se encuentra en el grupo prostético



Este complejo reacciona con una segunda molécula de peróxido de hidrógeno para formar los productos agua y dióxígeno y generar la enzima libre.



La capacidad para catalizar la destrucción del peróxido de hidrógeno en la reacción catalítica anterior, es una propiedad exclusiva de la catalasa y, en comparación con la actividad peroxidativa, se lleva a cabo a una velocidad extraordinariamente alta (Dounce, 1983).

Expresión diferencial de las isoenzimas de catalasa en algunos procesos de diferenciación

Se ha encontrado que durante las diversas etapas del ciclo de vida de varios organismos, tanto eucariotes como procariotes, se presenta más de una catalasa.

Redinbaugh y colaboradores (1990) demostraron que en el maíz existen isoenzimas de catalasa. Los RNA mensajeros que codifican para las diferentes catalasas se encuentran en distintos tejidos de la planta. El mensaje que corresponde a la *cat1* lo

encontraron en el escutelo, endospermo, grano inmaduro, hojas y epicotiledones. El de la *cat2* se detectó en el escutelo después de la germinación y en bajas concentraciones en hojas y epicotiledones. El mensaje de la *cat3* estuvo presente en epicotiledones, hojas y escutelo.

Se han reportado dos genes de catalasas en *Aspergillus niger*. El *catR* (clonado y secuenciado) y *catA* que se aisló por hibridación cruzada con el gen de catalasa *CTA1* de levadura. Este gen parece estar en los peroxisomas debido a que su expresión es inducida por ácidos grasos (Fowler *et al.*, 1993)

En *Aspergillus nidulans* existen por lo menos dos genes de catalasa cuya expresión se regula diferencialmente durante el desarrollo. Una catalasa se presenta durante el crecimiento y la otra se induce en la esporulación. De esta última el RNA mensajero y la proteína correspondiente se encuentran acumulados en las esporas (Navarro *et al.*, 1996).

En *Neurospora crassa* se han reportado tres catalasas. La *Cat1* presente durante el crecimiento rápido del micelio. La *Cat2* se expresa en la fase estacionaria y en niveles bajos en las conidias. Las *Cat3* es predominante en las esporas asexuales (Chary y Natvig, 1989). Lledías y Hansberg en trabajos realizados recientemente han determinado que posiblemente sólo existan dos catalasas en *Neurospora crassa* *Cat1* y *Cat2*. La primera siempre está presente y es la isoenzima predominante. *Cat2* es una catalasa que se forma durante la tensión oxidativa y formación de los conidios. Al oxidarse tanto *Cat1* como *Cat2* se generan otras enzimas activas (Lledías y Hansberg, en preparación)

En *Saccharomyces cerevisiae* hay evidencia genética de dos catalasas (Zitomer y Lowry, 1992). La catalasa típica, llamada *CTT1* que es citosólica y la regulan varios factores como el cobre, la hiperosmolaridad, el choque de calor, el oxígeno a través del grupo hemo y la limitación de nutrientes mediante el AMP cíclico (Belazzi *et al.*, 1991; Jungmann *et al.*, 1993; Schuller *et al.*, 1990). La catalasa atípica *CTA1* es peroxisomal y la regulan los ácidos grasos y el oxígeno a través del grupo hemo (Zitomer y Lowry, 1992).

En *Escherichia coli* se ha encontrado dos catalasas que se expresan diferencialmente durante el ciclo de vida de la bacteria y responden a diferentes estímulos (Loewen *et al.*, 1985). La *HPI* se induce durante el crecimiento logarítmico y

se sobreexpresa por peróxido de hidrógeno o ascorbato. La *HPH* se induce en la fase estacionaria (von Ossowski *et al.*, 1991) por tensión metabólica (stress) nutricional (Hengge-Aronis, 1993; Lowen y Triggs, 1984).

Catalasas en *Bacillus*

En *B. subtilis* Loewen y Switala consideran la existencia de dos catalasas. La *Cat1* que está presente durante el crecimiento y se induce al final de la fase de crecimiento exponencial y se sobreexpresa por peróxido de hidrógeno y ascorbato. La *Cat2* se induce con el inicio de la esporulación. Las esporas sólo presentan *Cat2*. Algunas cepas inutantes que no pueden esporular no presentan *Cat2* (Loewen y Switala, 1987²).

Ambas isoenzimas fueron purificadas y caracterizadas bioquímicamente por Loewen y Switala (1987¹ y 1988), (Tabla 1).

Tabla1. Caracterización bioquímica de *Cat1* y *Cat2* de *Bacillus subtilis* (datos obtenidos de Loewen y Switala 1987¹ y 1988).

	<i>Cat1</i>	<i>Cat2</i>
Peso molecular (kDa)	395	504
Estructura cuaternaria	homohexámero	homohexámero
Peso por subunidad (kDa)	65	81
Grupo hemo	protohemo IX	hemo-d unido covalentemente a la proteína
Km para H₂O₂ (mM)	40.1	78
Termoresistencia	100% inactivada a 65°C por 20 minutos	50% inactivada a 93°C por 4 minutos
pH óptimo de actividad	5 a 11	4 a 12
Inhibición por cianuro	50% con 0.1 mM	50% con 0.01mM
Inhibición por azida	50% con 0.002 mM	50% con 0.06 mM

La resistencia que desarrolla *B. subtilis* a las condiciones de tensión oxidativa se lleva a cabo a través de por lo menos dos redes que se regulan independientemente (Bol y Yasbin, 1990, 1994). Primero la exposición de células a EROS (relacionados al H_2O_2) inducen el sistema SOB. Esta inducción requiere de la función reguladora de la proteína RecA así como de la reparación enzimática del DNA (Love y Yasbin, 1984). Segundo, la resistencia a todas las concentraciones de H_2O_2 , depende sobre todo de la expresión del gen funcional *kataA'* (Bol y Yasbin, 1990). Este gen codifica para una catalasa y ya fue clonado y secuenciado (Bol y Yasbin, 1991).

HIPÓTESIS

Al tomar en cuenta la información anterior se planteó la siguiente hipótesis:

Si la catalasa es una enzima antioxidante y la diferenciación celular posiblemente es inducida por un estado de tensión oxidativa en el interior de las bacterias, se espera encontrar durante el ciclo de vida de *Bacillus cereus* una expresión diferencial de las catalasas.

Dado que se ha probado la existencia de isoenzimas durante la esporulación de *Bacillus subtilis*, será interesante discernir su nivel de expresión en los compartimentos del esporangio: célula madre y endosporas. Es posible que una catalasa de la esporulación sólo se exprese en el compartimento de la endospora.

OBJETIVOS

Con este trabajo que forma parte del proyecto de investigación "Las catalasas y la diferenciación celular", se pretende cumplir con los siguientes objetivos.

-Determinar el número de isoenzimas y los cambios de la actividad de la catalasa durante las diferentes etapas del ciclo de vida de *Bacillus cereus*.

-Relacionar la aparición de las isoenzimas y los cambios de la actividad de catalasa en el ciclo de vida de *Bacillus cereus*, con la posible existencia de un estado hiperoxidante.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de muestras de *Bacillus cereus* en crecimiento logarítmico, en diferentes tiempos del proceso de esporulación y en esporas libres

Se trabajó con una cepa silvestre de *Bacillus cereus* aislada y caracterizada por Andreoli *et al* (1973).

Para lograr el crecimiento de las bacterias en el laboratorio, se utilizó el medio G (fermentable) descrito por Hanson (1963). Se aumentó la concentración de sacarosa, extracto de levadura y fosfatos al doble con el propósito de obtener una masa celular mayor. Los componentes del medio G doble fueron:

0.2% de extracto de levadura

0.2% de sacarosa

0.2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.1% de K_2HPO_4

0.02% de MgSO_4

0.005% de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0.0025% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.0005% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.00002% de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.0005% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Los cultivos se realizaron en un biofermentador de 25 litros de capacidad, construido por el Centro de Instrumentos de la UNAM, bajo condiciones aerobias, a temperatura de 30°C, con un flujo de aire promedio de 10 litros por minuto y una agitación de 250 rpm.

El volúmen del inóculo fue del 4% del volúmen total del fermentador. Para sincronizar el inóculo se hizo crecer el bacilo hasta la etapa logarítmica. Luego se tomó

una alícuota de éste y se transfirió a un matraz con medio G doble. Lo anterior se repitió de 3 a 4 veces seleccionando así a los organismos que crecen más rápido.

Durante el crecimiento bacteriano se siguió la densidad óptica a 540 nm, el pH del medio y se observaron las células por microscopía óptica (Fig. 8). La fase logarítmica se obtuvo a las 2 horas de haber inoculado el biofermentador. El comienzo de la esporulación (fase t_0) se consideró a los 30 minutos después de alcanzar el cultivo un pH mínimo (Fig. 9). A partir de ahí, se cosecharon 2 litros de muestra de cada una de las etapas del proceso de esporulación (t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 y t_8). Para obtener esporas libres el cultivo se cosechó después de 24 h.

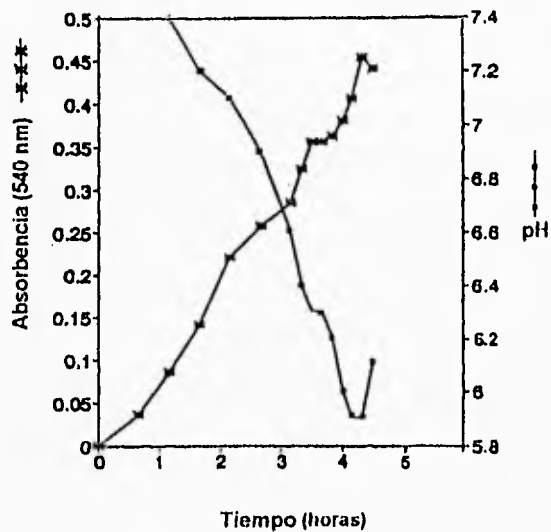


Figura 8. Variación del pH y densidad óptica durante el cultivo de *Bacillus cereus*.

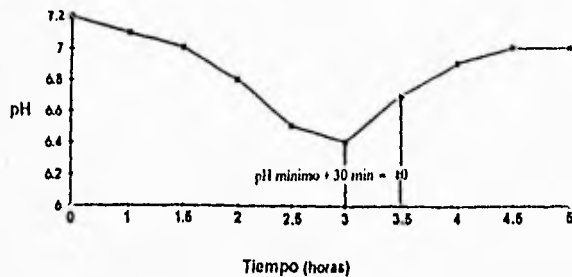


Figura 9. Determinación de la etapa t0 en un cultivo de *Bacillus cereus* a partir del pH mínimo.

Al recolectar las muestras se les adicionó 20 $\mu\text{g/ml}$ de cloramfenicol para inhibir la síntesis de proteínas durante la cosecha. Las manipulaciones se llevaron a cabo a 4 °C. La centrifugación se realizó en una centrifuga Beckman J2-21 a 5,000 rpm, durante 10 minutos, para las muestras en serie. Las esporas libres se cosecharon en una centrifuga marca Sharples TI de flujo continuo.

Las células obtenidas se lavaron 3 veces con agua destilada y se guardaron a -20 °C.

Obtención de las células germinadas

Un volumen de esporas se disolvió en dos volúmenes de una solución de Tritón X-100 al 0.5%. Después de permanecer en agitación por 30 minutos a 4°C, las esporas se centrifugaron a 8,000 rpm en una centrifuga Beckman J2-21, rotor JA-10 a 4°C. Se lavaron 5 veces con agua destilada y se guardaron a -20 °C.

El tratamiento anterior se realizó con el fin de eliminar la catalasa 1 presente en el exosporio (datos obtenidos por Layla Michán) y como activador del proceso de germinación.

Las esporas activadas se colocaron en medio G doble a una densidad óptica a 540 nm de entre 0.5 y 0.9. A partir de ahí se obtuvo la curva de germinación.

Con el mismo tratamiento se obtuvieron las muestras de las esporas germinadas a los 10 y 40 minutos, que corresponden a los tiempos en que se registra el mínimo en la densidad óptica y las primeras respuestas de las células al contacto con germinantes y la etapa avanzada de germinación, con el aumento del volumen celular por la entrada de agua y la activación del metabolismo.

Bajo las condiciones anteriormente descritas, se lavaron las células 3 veces y se congelaron.

Ruptura de las células

Las células se rompieron por dos métodos diferentes. Uno de ellos incluye un proceso de descompresión, en el cual las bacterias se someten a elevadas presiones ($30,000 \text{ lb/in}^2$) y luego se pasan subitamente a presión ambiental. Para lograr esto se utilizó la RIBI. Esta técnica resulta útil para bacterias en fase vegetativa o que se encuentran en las primeras etapas de esporulación.

El otro método rompe las células por medio de la fricción provocada al agitarlas en presencia de perlas de vidrio de 150 a 212 μm de diámetro. Se dieron pulsos de 30 segundos con intervalos de 2 minutos en frío, con 10 ciclos acumulados. Con el uso de la Bead Beater se mantuvo el sistema a 4°C. Este procedimiento resultó efectivo cuando se requirió romper esporangios (tanto célula madre como endospora) en etapas avanzadas del proceso de esporulación y esporas libres o germinadas.

En ambos casos, a las muestras se les puso 15 $\mu\text{g/ml}$ de fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) para inhibir proteasas. Para romper la viscosidad de las muestras

provocada por la presencia de grandes cantidades de ácidos nucleicos se trató la muestra con DNAsa

Se centrifugó a 40,000 rpm en una ultracentrifuga Beckman L-60 y se recuperó por decantación el sobrenadante libre de membranas en el cual se encontró la actividad de catalasa.

Separación de los compartimentos del esporangio

Para obtener los compartimentos de la endospora y la célula madre por separado se siguió la técnica descrita por Andreoli *et al* (1975) y modificada por Escamilla (1986).

Los esporangios cosechados se lavaron dos veces con amortiguador TCM pH 7.4 (50 mM Tris-HCl, 5 mM Ca y 5 mM MgCl₂), a 8,000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en una solución al 30 % de sacarosa en TCM y se agregaron 15 µg/ml de PMSF. El homogeneizado de esporangios se sometió a una presión de 30,000 lb/in² en la RIBI. Como producto del proceso de descompresión se rompió el compartimento de la célula madre dejando íntegras a las endosporas. El material resultante se incubó con DNAsa por 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó dos veces a 1,500 x g por 10 min. para eliminar los esporangios enteros de la muestra.

Para separar a las endosporas se volvió a centrifugar a 8,000 x g por igual tiempo. Del sobrenadante que contenía la catalasa de la célula madre se eliminaron las membranas y los demás restos celulares al centrifugar a 144,000 x g por 40 minutos.

El precipitado de endosporas se lavó 2 veces con una solución al 30% de sacarosa en TCM a 8,000 x g por 10 minutos. Para una mejor purificación se repitió lo anterior pero con una solución al 40 % de sacarosa en TCM. Se rompieron utilizando la RIBI o perlas según la etapa de maduración de las endosporas.

Determinación de la cantidad de proteína

La cantidad de proteína de las muestras se determinó por el método originalmente descrito por Lowry (1951) 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 μ l de un stock de albúmina bovina a una concentración de 1 mg/ml. En otros tubos se colocaron concentraciones crecientes de la muestra problema o bien, cuando se conocía el intervalo de proteína, se trabajó por duplicado. En ambos casos se aforó a 50 μ l con agua destilada. A todos los tubos anteriores se les agregó 1 ml de la siguiente mezcla:

1 ml de Cu SO_4 al 1%

1 ml de Tartrato de sodio y potasio al 2%

25 ml de NaOH 0.1 N que contiene Na_2CO_3 al 2 %

Se agitaron en el Vortex y después de reposar 10 minutos a temperatura ambiente se adicionaron 50 μ l de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1-1. Nuevamente se agitó y, a los 10 minutos de reposo, se tomó la lectura en el espectrofotómetro a 750 nm. Como referencia, se usó el tubo de la curva patrón que no contenía albúmina.

Determinación de la actividad específica y total de catalasa

El método usado para conocer la actividad de catalasa fue el descrito por Rorth y Jensen en 1967 y consistió en determinar la velocidad de producción del oxígeno molecular a partir de H_2O_2 . Esto se logró utilizando un oxígrafo Yelow Spring Modelo 57 y un electrodo de Clark que mide el O_2 producido en una cámara de 3 ml de capacidad, termorregulada a 30°C.

Los ensayos para medir la dismutación del peróxido se llevaron a cabo adicionando a la cámara lo siguiente:

1) Tres ml de amortiguador de fosfatos 0.1M y pH 7.0 previamente burbujeado con nitrógeno con el fin de disminuir lo más posible la cantidad de oxígeno presente en la cámara.

2) Un volumen de la muestra a analizar (10, 20, 50, 100 μ l según el caso).

3) Seis μ l de una solución de H_2O_2 diluida 1 a 1 con agua destilada (concentración final en la cámara de 8.8 mM).

La actividad específica de la catalasa fue definida como la cantidad de nanoátomos gramo de dióxígeno que fueron producidos a 30°C, en un minuto, por miligramo de proteína (nátm. O_2 /min/mg prot.). Para la actividad total de la catalasa se modificó la actividad obtenida por el total de miligramos de muestra nativa.

Electroforesis en geles 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 para electroforesis marca Hoeffer con placas de vidrio de 8 cm de ancho por 7 de alto y separadores de 1.5 mm de grosor.

El gel inferior fue al 7.5 % y el superior al 4.5% de una solución al 30% y 0.8% de acrilamida-bis-acrilamida en agua y amortiguador TRIS 1.5 M, pH 8.1 a una concentración final de 0.35 M . Para polimerizar la acrilamida se agregaron 75 μ l de persulfato de amonio al 10 % y 15 μ l de TEMED.

El amortiguador de la cámara fue una solución de TRIS 0.025 M y glicina 0.192 M, pH 8.3 (Perry, 1994)

Las muestras se diluyeron 1 a 1 con la siguiente solución: 1% glicerol, 5% TRIS 1.5 M pH 8.1 y 2.9 μ M de azul de bromofenol. El glicerol aumentó la densidad de las

muestras y evitó que se diluyeran en el amortiguador de la cámara. El colorante permitió seguir el frente de la muestra separada en el gel.

El campo eléctrico generó una corriente constante de 3 miliampers por cm de longitud del gel (21-25 miliampers). El tiempo total de corrida fue de 3.5 horas.

Se hicieron geles por duplicado, uno se reveló para observar actividad de catalasa, y otro con azul de Coomassie para ver las proteínas.

Determinación de las isoenzimas de catalasa por medio de zimogramas

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

El gel se enjuagó con agua destilada y se dejó incubando 15 minutos en una solución 30 μM de H_2O_2 , a temperatura ambiente. Por otra parte, al momento se preparó una solución con ferricianuro de potasio y otra con cloruro férrico ambas de 1 g disueltas en 50 ml de agua destilada.

Después se enjuagó el gel con agua destilada y se incubó con la mezcla de las dos soluciones anteriores. Los componentes de la mezcla precipitan en presencia del peróxido de hidrógeno y tiñen el gel de azul. En las zonas donde no existe H_2O_2 , debido a la presencia de catalasa, no hay precipitación, y quedan bandas incoloras. Una vez obtenido el contraste descado en el gel, se puso una solución al 10% de ácido acético y 30% de metanol para evitar la precipitación de más colorante.

RESULTADOS

Isoenzimas y variaciones de la actividad específica de catalasa durante el crecimiento logarítmico y el proceso de esporulación de *Bacillus cereus*

Como punto de partida se realizaron ensayos con los homogeneizados de células obtenidas en las fases *log*, *t0*, *t3* y esporas libres que corresponden a las etapas del ciclo de vida de *Bacillus cereus* en donde se registran modificaciones bioquímicas y morfolisiológicas, esperando encontrar en las mismas una variación en la expresión de isoenzimas de catalasa, así como de su actividad.

La actividad específica de catalasa registrada en este primer cultivo tiende a aumentar en las etapas *log*, *t0* y *t3*. De la fase de crecimiento logarítmico a *t0* (estacionaria) se detectó un incremento de la actividad específica de catalasa de más de tres veces, registrando para el primer caso un valor de 4,000 y para el segundo 12,084 $\text{nát.O}_2/\text{min/mg}$ proteína (Fig. 10).



Figura 10. Actividad específica de catalasa registrada en el sobrenadante de homogeneizados de *Bacillus cereus* en etapa logarítmica (*log*), *t0*, *t3*, y esporas (*esp*).

Los zimogramas que se realizaron para detectar la aparición de isoenzimas de catalasa fueron cargados por proteína y revelaron una banda con igual migración en las

etapas *log*, *t0* y *t3* (Fig. 11). Esta banda se denominó catalasa 1 o logaríunica por ser característica de esta fase del desarrollo de *B. cereus* y en concordancia con la nomenclatura propuesta por Loewen y Switala (1986, 1988) para las isoenzimas de *B. subtilis*. En las esporas se presentaron 2 isoenzimas, una que coincide con las antes descritas (*Cat1*) y otra de menor movilidad electroforética, conocida como *Cat2* o de esporas.

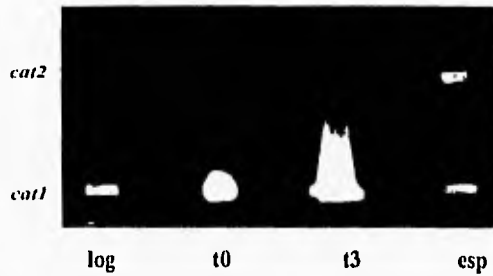


Figura 11. Zimograma de las catalasas presentes en diferentes etapas del ciclo de vida de *Bacillus cereus*. Las muestras corresponden al sobrenadante de homogeneizados de la etapa de crecimiento logarímico (*log*), etapas *t0* y *t3* de esporulación y esporas libres (*esp*).

Además del aumento de actividad de catalasa en *t0* llamó la atención el aumento de actividad que tiene lugar de *t0* a *t3* y la isoenzima *Cat2* que se detectó en esporas. Debido a esto se decidió hacer otro cultivo en el que se obtuvieron bacterias desde *t0* hasta *t8* con la finalidad de:

- 1) conocer la fase durante la esporulación en donde aparece la catalasa 2 presente en las esporas,
- 2) precisar si el aumento de la actividad de catalasa se da en *t3* o en una etapa anterior no ensayada, y
- 3) detectar la existencia de otras posibles fluctuaciones de la misma en las fases tardías del proceso esporulación.

Las muestras obtenidas de este segundo cultivo nuevamente registraron una tendencia al incremento de la actividad específica de catalasa (Fig. 12). Durante las fases

t2 y t3 se dio el mayor aumento, los valores registrados fueron de 19, 390 $\mu\text{m.O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteina en t0; 17, 215 en t1; 35, 644 en t2 y 35, 644 en t3. Durante las etapas posteriores el incremento fue discreto. Los zimogramas revelaron una sola banda de actividad en cada una de las diferentes etapas de esporulación.

En el gel de la figura 13 se pusieron 10 microgramos de proteina por muestra. La isoenzima que se observa, migra igual en todas las muestras y coincide con la que se presenta en etapa logarítmica (*Cat1*).



Figura 12. Actividad específica de catalasa registrada en el sobrenadante de homogeneizados de *Bacillus cereus* en etapas t0 a t8 de esporulación.

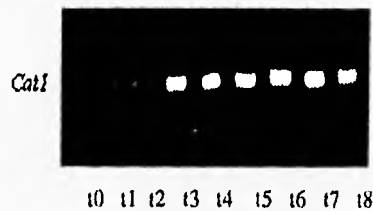


Figura 13. Zimograma de la catalasa presente durante la esporulación de *Bacillus cereus*. Las muestras fueron obtenidas del sobrenadante de homogeneizados en etapas de t0 a t8.

No logramos detectar la actividad de *Cat2*, debido posiblemente a su baja actividad y baja eficiencia en la ruptura de las endosporas.

Con las muestras de las etapas *t0* a *t4*, obtenidas de un tercer cultivo, se observó nuevamente una tendencia de aumento en la actividad específica de catalasa. En *t3* el incremento que se da es de más del doble, de 39,389 nAt O₂/min/mg proteína en *t2* a 89,622 en *t3* (Fig.14).

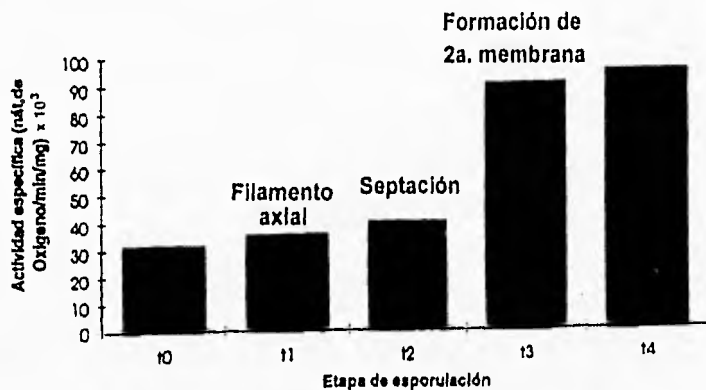


Figura 14. Actividad específica de catalasa registrada en el sobrenadante de homogenizados de *Bacillus cereus* obtenidos durante las primeras etapas del proceso de esporulación (*t0* a *t4*).

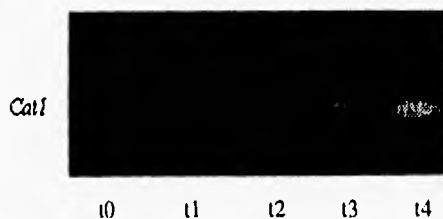


Figura 15. Zimograma de la catalasa presente en las primeras etapas de esporulación de *Bacillus cereus*. Las muestras son del sobrenadante de homogenizados en *t0* a *t4*.

La isoenzima que se detectó en las etapas de *t0* a *t4* fue nuevamente, de acuerdo a su movilidad electroforética, la banda correspondiente a *Cat1* (Fig. 15). En este gel se corrieron 60 microgramos de proteína por carril.

No se logró ver en ninguna muestra de los tres cultivos la banda característica de *Cat2*.

Expresión diferencial de las catalasas en los compartimentos del esporangio de *Bacillus cereus*

Fue sorprendente el hecho de que *cat2* no pudo ser detectada en las muestras obtenidas de la ruptura del esporangio completo. Para descartar un posible artificio debido a la falta de ruptura de las endosporas se decidió recurrir al método de separación de los compartimentos del esporangio. Así podemos obtener, por una parte la(s) catalasa(s) que se presenta en la célula madre, y, por otra, la(s) catalasa(s) existentes en las endosporas. Además, tendríamos la ventaja que la *Cat1* de la célula madre no enmascara la determinación de la *Cat2* que posiblemente se encuentra en la endospora. También nos permitiría trabajar con un material semipurificado, a partir del cual el rendimiento de la extracción de catalasa sería mayor.

Para este experimento se utilizaron esporangios en *t4*, *t5* y *t6*. La catalasa de la célula madre de *t4* y *t5* coincide con la banda de *Cat1*, la de *t6* migra más rápido, y de manera similar a la banda obtenida de las endosporas en *t4* y *t6* (Fig. 16). Se puso como referencia catalasa de hígado de bovino y se observó que migraba menos que las catalasas de *B. cereus*, cosa que llamó la atención.

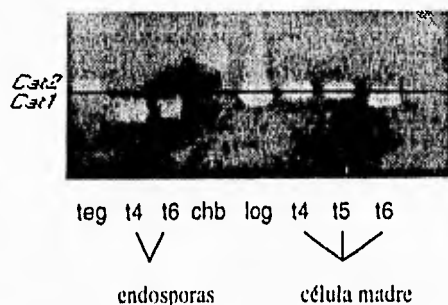


Figura 16. Zimograma de las catalasas presentes en los compartimentos del esporangio de *Bacillus cereus*. Se pusieron muestras de los tegumentos de las esporas (*teg*), endosporas en 14 y 16, catalasa de hígado de bovino (*chb*), células en crecimiento logarítmico (*log*) y el compartimento de la célula madre en etapas 14, 15 y 16.

Isoenzimas de catalasa en las esporas libres de *Bacillus cereus*

La catalasa 1 estuvo presente en el ciclo de vida de *B. cereus* desde el crecimiento logarítmico hasta las esporas libres. A diferencia de las de *B. subtilis*, que poseen solo *Cat2* (Lowen y Switala, 1987² y 1988), las esporas de *B. cereus* presentan tanto *Cat1* como *Cat2* (Fig. 17).

En algunos experimentos paralelos realizados por Layla Michán en el laboratorio, se observó que la isoenzima que tiene una movilidad electroforética similar a la *Cat1* se encuentra en los tegumentos que cubren a la spora, de ahí la denominación de *Cat teg*, a diferencia de la *cat2* que se localiza en el citoplasma de la spora.

En los homogeneizados de esporas que contenían ambas isoenzimas, *Cat2* y *Cat teg*, se registró una actividad de 36,654 nít.O₂/min/mg de proteína. Al tratarlas con una solución al 0.5% de SDS o Triton X-100 para eliminar los tegumentos de las esporas, la actividad mayoritaria (24, 584 nít.O₂/min/mg de proteína.) se presenta en la solución del lavado. Esta, al ser corrida en un gel, sólo revela una banda que tiene movilidad cercana a la *Cat1*.

Por otra parte, el homogeneizado de esporas sin tegumentos presentó un mínimo de actividad (1,575 nlt.O₂/min/mg de proteína.) y una sola isoenzima que migra cerca de *Cat2* (Fig. 17). En esta muestra no se detectó actividad de *Cat1*.

La variabilidad, en cuanto a la migración de las bandas aisladas con respecto a las obtenidas de homogeneizados de esporas nativas, se puede deber a los tratamientos a que se sometieron.

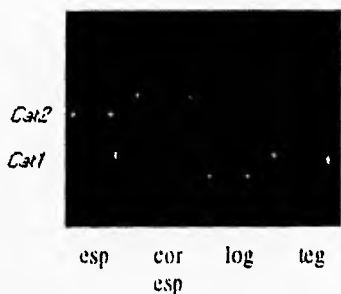


Figura 17. Zimograma de las catalasas presentes en esporas de *Bacillus cereus*. Las muestras son del sobrenadante de homogeneizados de esporas libres (*esp*), cuerpo de la spora (*cor esp*), células en crecimiento logarítmico (*log*) y tegumentos de las esporas (*teg*).

Isoenzimas y variación de la actividad específica de catalasa durante la germinación de *Bacillus cereus*

Con el fin de completar el estudio de la expresión de isoenzimas de catalasa durante el ciclo de vida de *B. cereus* y definir la fase en donde se lleva a cabo la transición entre la desaparición de *Cat2* y la aparición de *Cat1* en la célula vegetativa, se midió la catalasa durante la germinación de esporas.

Durante la germinación de esporas hay registro de una caída rápida de la absorbencia indicando el colapso de la corteza la cual influye en la refringencia de la spora (Hashimoto *et al.*, 1969). A los pocos minutos la absorbencia se reestablece gradualmente debido a la entrada de agua a la célula.

Para conocer el tiempo en que la absorbencia alcanza un mínimo y posteriormente se incrementa, decidimos muestrear a tiempos cortos a partir de que se adicionan los germinantes en las esporas (Fig. 18).

Con base en los datos de la curva y considerando que a los pocos minutos de agregar los germinantes se producen los primeros cambios relacionados con la pérdida de la latencia en las esporas (Scott y Ellar, 1978 y Hashimoto *et al.*, 1969) elegimos el minuto 10 como primera muestra, que coincide con el mínimo de la absorbencia. A los 40 minutos se obtuvo otra muestra que está relacionada con la activación del metabolismo celular.

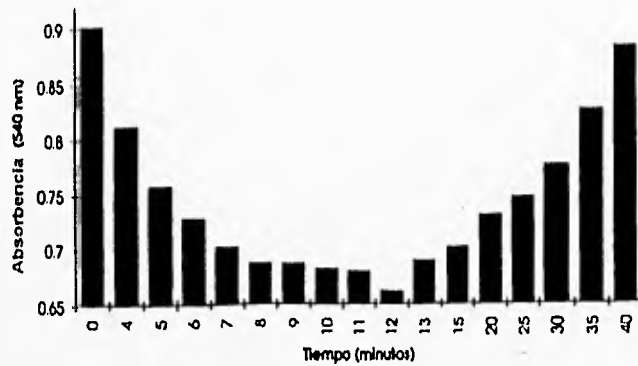


Figura 18. Variación de la densidad óptica en esporas de *Bacillus cereus* sin tegumentos durante la germinación.

En cuanto a las isoenzimas se observó tanto a los 10 min como a los 40 min, una banda de mayor movilidad que migra por debajo de la *Cat1* y una serie de bandas que no se definieron con precisión y que migran más lento (Fig. 19).

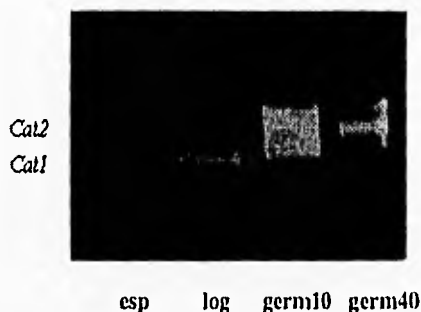


Figura 19. Zimograma de las catalasas presentes en la germinación de esporas de *Bacillus cereus*. Se corrieron muestras del sobrenadante de homogeneizados de esporas (*esp*); de células en etapa de crecimiento logarítmico (*log*) y esporas sin tegumentos germinadas a los 10 y 40 minutos (*germ10* y *germ40*).

La actividad de catalasa en los homogeneizados aumentó 18 veces a los 10 minutos de germinación y 29 veces a los 40 minutos de germinación con respecto a la actividad de la espora sin tegumentos a tiempo cero (Fig. 20).

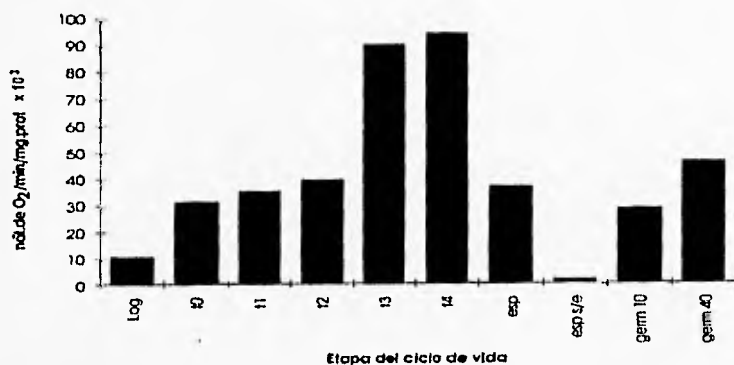


Figura 20. Variación de la actividad específica de catalasa durante el ciclo de vida de *Bacillus cereus*. Las muestras que se analizaron corresponden al sobrenadante de homogeneizados de células en etapa de crecimiento logarítmico (*log*), 10, 11, 12, 13 y 14 de esporulación, esporas libres (*esp*), esporas sin tegumentos (*esp s/e*) y esporas sin tegumentos germinadas a los 10 y 40 minutos (*germ 10* y *germ 40*).

DISCUSIÓN

Causa de las variaciones en la actividad específica de la catalasa durante la esporulación de *B. cereus*, isoenzimas presentes y su posible relación con un estado de tensión oxidativa

El aumento de actividad de la catalasa en la fase de crecimiento estacionario que se detectó para *B. cereus* también ha sido observado en *B. subtilis* (Loewen y Switala, 1987¹) y en *E. coli* (Loewen *et al.*, 1985). Estos autores determinaron que el aumento de actividad de catalasa en *t0* está relacionado con síntesis de catalasa, especialmente *CatI*.

En *B. cereus* en *t0* sólo se registró la presencia de *CatI*, siendo ésta isoenzima la responsable del incremento de la actividad. En cuanto a la actividad total se detectó un incremento del doble. Podríamos esperar que durante la etapa de crecimiento estacionario de *B. cereus* ocurra la síntesis de *CatI*.

El crecimiento estacionario en *E. coli* puede considerarse como un estado diferenciado (Hengge-Aronis, 1993). Este último según Hansberg y Aguirre (1990) se logra como producto de una serie de cambios celulares que se dan para contrarrestar el estado hiperoxidante que afecta al sistema y que conducen a un estado diferenciado estable.

Cuando *Bacillus cereus* llega a fase de crecimiento estacionario, ya se encuentra posiblemente en estrés oxidativo. Esta condición se alcanza al generarse EROS a partir del dióxígeno acumulado durante el crecimiento logarítmico. Además en *t0* hay limitación de nutrientes lo que conduce a que el poder reductor disminuya y aumente la concentración intracelular de EROS (Hansberg y Aguirre, 1990). Para que las bacterias compensen el estado hiperoxidante, requieren regular sus mecanismos antioxidantes. Así, bajo estas condiciones se induce el incremento de la actividad de la catalasa.

En relación a esto último, Lowen y Switala (1987¹) en *B. subtilis* determinaron que la síntesis de *CatI* puede ser inducida 30 veces por peróxido de hidrógeno, lo que les

llevó a sugerir que *in vivo* el incremento de *CatI* podría ser el resultado del H_2O_2 generado en la fase de crecimiento estacionario.

Un segundo aumento de la actividad específica de la catalasa, está relacionado con las etapas en las que se lleva a cabo la compartimentalización del esporangio, entre *t2* y *t3*, dependiendo de la sincronía de las bacterias. En un cultivo asincrónico se observan cambios graduales a diferencia de un cultivo sincrónico en donde los cambios se detectan bruscamente. En base a lo anterior podemos explicar la variación gradual de la actividad de catalasa que abarca las fases *t2* y *t3* de esporulación en el cultivo 2 (Fig. 12), y el aumento drástico que se da en *t3* en el cultivo 3 (Fig. 14).

Podemos considerar a *CatI* como la responsable del incremento en la etapa de compartimentalización bacteriana, ya que fue la única isoenzima observada en los zimogramas de esta fase. Al tomar en cuenta que durante el proceso de esporulación, la síntesis de proteínas no sufre variaciones notables (Doi, 1969) y que la actividad total de catalasa aumenta en esta etapa, es posible que alrededor de *t3*, se sintetice una mayor cantidad de catalasa en comparación con las fases de desarrollo anteriores.

Entre *t2* y *t3* se forma la segunda membrana de la preespora como producto del engullimiento de la célula madre. Durante estas etapas la respiración ya es activa nuevamente y, en esta condición, también se generan EROS durante la reducción del dióxígeno a agua. Para asegurar la sobrevivencia de la espora, durante el engullimiento se requiere compensar adecuadamente el nivel oxidativo intracelular, de tal forma que el compartimento de la endospora esté en equilibrio con sus mecanismos oxidoreductores. Para evitar que se genere un estado hiperoxidante en esta fase, el incremento en la actividad de la catalasa juega un papel muy importante.

El aumento gradual de la actividad específica de catalasa en etapas posteriores a *t3* se le puede también atribuir a la *CatI*, ya que es la única banda presente en los zimogramas.

Una vez que el compartimento de la endospora queda delimitado por las dos membranas, después de *t3*, el esporangio continúa el proceso de esporulación, manteniendo más o menos estables sus niveles de actividad de catalasa.

Heterogeneidad de las bandas de catalasa al separar los compartimentos del esporangio, en la germinación y al aislar las catalasas de esporas de *Bacillus cereus*

Al separar los compartimentos del esporangio en las etapas *t4*, *t5* y *t6*, no se detectó en los homogeneizados de endosporas una banda similar a *Cat2*. Sin embargo, se presentó una banda que se localiza por debajo de *Cat1*. Esto también se observó en la célula madre en *t6*.

Los reportes sobre la heterogeneidad de la catalasa han sido numerosos según Bonaventura (1972), Scandalios (1968) describe que la heterogeneidad de la catalasa del maíz es de origen genético. En contraposición Holmes y Masters (1970) determinaron que no existe relación genética alguna con la heterogeneidad que presenta la catalasa del hígado de ratón.

Actualmente Lledfas y Hansberg han encontrado que la migración electroforética de las dos catalasas, que consideran presentes en *Neurospora crassa*, aumenta en relación al grado de oxidación que sufre la enzima al ser expuesta a oxígeno en "single". Esta misma tendencia la han observado en la catalasa de hígado de bovino (Lledfas y Hansberg, en preparación).

Considerando lo anterior, las bandas que se observan en los zimogramas de catalasa en una posición inferior a la de *Cat1* en los extractos de la célula madre en *t6*, y de endosporas en *t4* y *t6* pueden ser producto de la oxidación de *Cat1* por una especie de oxígeno reactiva capaz de modificarla. Otra posibilidad es que las catalasas se modifiquen como resultado de la actividad proteolítica que aumenta durante el proceso de esporulación (Doi, 1969). En *t6* en la célula madre se presenta mayor actividad proteolítica que en *t5*, posiblemente este factor influya en que la catalasa de *t6* migre más rápido que la presente en *t5*, debido a que el grado de modificación estructural de la enzima en el primer caso es tal que afecta su migración electroforética.

No pudimos detectar la aparición de la *Cat2* durante la esporulación, que era nuestro objetivo inicial en éstos experimentos. Solo la observamos en la espora madura.

Es posible que la *Cat2* se exprese tardíamente, cuando la espora ya se encuentra totalmente madura.

En cuanto a las esporas durante la germinación, las diferentes bandas de actividad que se presentan en los homogeneizados a los 10 y 40 minutos pueden ser producto de oxidación de la *Cat2*, que es la única isoenzima presente en las esporas sin tegumentos.

Rangel y Hansberg han encontrado que durante la germinación de las esporas de *Neurospora crassa* y de *B. cereus* se genera quimioluminiscencia que posiblemente se debe a la generación de especies de oxígeno reactivas. Relacionado con esto Lledas y Hansberg encontraron que las catalasas de *Neurospora crassa* también se modifican durante la germinación de las conidias. Es posible que durante la germinación de esporas de *B. cereus* la *Cat2* se modifique por oxígeno en "singlet".

Durante la germinación se pierden los tegumentos que recubren a la espora y el estado de latencia cesa. Al entrar a la célula el agua junto con el dióxígeno y activarse el metabolismo, se generan condiciones de tensión oxidativa que requieren de una actividad mayor de catalasa para estabilizar niveles oxidorreductores intracelulares. Lo anterior podría explicar el aumento en la actividad específica de catalasa registrada a los 10 minutos y la misma tendencia que se sigue a los 40. Varias bandas que no se lograron definir con precisión parecen ser las responsables del incremento de la actividad.

Conforme avanza la germinación esperaríamos que desapareciera la serie de bandas de *Cat2* y se originara la banda de *Cat1*, que es la catalasa de la etapa de crecimiento logarítmico. Sería interesante realizar estos experimentos ya que con ellos se completaría el ciclo de expresión de las isoenzimas de catalasa a lo largo del desarrollo de *B. cereus*.

En cuanto a la heterogeneidad de las bandas de catalasa aisladas de los tegumentos y del cuerpo de la espora con relación a las bandas obtenidas de las esporas integras posiblemente se deba a modificaciones de la enzima producto de los tratamientos a que se sometieron.

Diferencia en movilidad de las catalasas de *Bacillus cereus* y la catalasa de hígado de bovino

En el gel de la figura 16 se observa que la banda de catalasa de hígado de bovino queda por encima de las bandas de catalasa *B. cereus*, contrario a lo que esperaríamos.

Si las catalasas de *B. cereus* son estructuralmente similares a las de *B. subtilis*, seguramente estaríamos hablando de catalasas homohexaméricas con un peso molecular entre 400 y 500 kDa. En comparación, la catalasa de hígado de bovino es un tetrámero con un peso molecular cercano a 240 kDa por lo que esperaríamos que migrara más rápido.

Loewen y Switala (1987) reportaron un efecto de disociación de la catalasa de *B. subtilis* en dímeros activos, que lo atribuyeron al uso del amortiguador TRIS-glicina en los geles de electroforesis.

Al considerar lo anterior podemos explicar la ubicación de las catalasas de *B. cereus* en los geles nativos. Las unidades hexaméricas son susceptibles a la disociación y generan dímeros que conservan la capacidad catalítica y que corresponden posiblemente a las bandas que encontramos por debajo de la catalasa de bovino. Sin embargo sería importante realizar experimentos para determinar que forma oligomérica es la que se presenta en los geles y las causas que provocan su disociación, si es que efectivamente este efecto está ocurriendo.

CONCLUSIONES

-Las isoenzimas de catalasa se expresan diferencialmente durante el ciclo de vida de *Bacillus cereus*. En la etapa de crecimiento logarfmico se presenta una s3la banda de actividad (*Cat1*). En *t0*, *t1*, *t2*, *t3*, *t4* y dem3s etapas de esporulaci3n se ha logrado detectar solamente una banda con *Cat1*.

En las esporas se presentan dos bandas de catalasa: la *Cat teg* en el exosporio (que tiene una migraci3n electrofor3tica cercana a *Cat1*) y que representa el mayor porcentaje de la actividad total y la *Cat2*, que se localiza en el cuerpo de la spora y que es la actividad minoritaria. *Cat2* parece expresarse al final del proceso esporulatorio.

Durante la germinaci3n de las esporas, que s3lo poseen *Cat2*, aparecen una serie de bandas las cuales pueden ser especies modificadas de *Cat2*, productos de prote3lisis 3 de la oxidaci3n por ox3geno en "single".

-La actividad especfca de catalasa varfa durante el ciclo de vida de *Bacillus cereus*. Hay tres incrementos notorios en la actividad especfca de catalasa, el primero se da durante la fase de crecimiento estacionario (*t0*). El segundo cambio se da entre *t2* y *t3*, cuando se compartimentaliza el esporangio. Y el tercer incremento tiene lugar al principio de la germinaci3n. Las tres etapas corresponden a momentos de transici3n hacia un estado celular diferente y est3n relacionadas con condiciones en las que se promueve la generaci3n de un estr3s oxidativo.

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- Determinar el momento de la aparición de *Cat2* en las esporas de *B.cereus*.
- Seguir la germinación de esporas sin tegumentos hasta determinar el momento de transición entre la aparición de *Cat1* y desaparición de *Cat2*.
- Determinar la estructura oligomérica de *Cat1* y *Cat2* en solución y en los geles.
- Determinar si los cambios de movilidad electroforética obedecen a una proteólisis parcial de la enzima.
- Clonar y secuenciar el gen que codifica para *Cat2* con el fin de aclarar su origen.

BIBLIOGRAFIA

-Allgood, G. S., y Perry, J. J. (1986) Characterization of manganese containing catalase from the obligate thermophile *Thermoleophilum album*. *J. Bacteriol.* 168: 563-567.

-Andreoli, A. J., Suchiro, S., Sakiyama, D., Takemoto, J. J., Vivanco, E., Lara, J. C., y Kute, M.C. (1973) Release and recovery of forespores from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 115: 1159-1166.

-Andreoli, A. J., Saranto, J., Beacker, P. A., Suchiro, S., Escamilla, J. E. y Steiner, A. (1975) Biochemical properties of forespore isolated from *Bacillus cereus*. En Gerhardt, R., Castilow, N. y Sadoff, H. L. (ed.). Spores IV. American Society of Microbiol. p. 418-424.

-Archibald, R. A. (1989) The *Bacillus* cell envelope. En Harwood, C. (ed.) *Bacillus*. vol. 2. p. 217-254.

-Belazzi, T., Wagner, A., Wieser, R., Schanz, M., Adam, G., Hartig, A. y Ruis, H. (1991) Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (CTT) gene by cAMP is mediated by a positive control element. *EMBO J.* 10: 585-592.

-Bol, D. K., y Yasbin, R. E. (1990) Characterization of an inducible oxidative stress system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 172: 3503-3506.

-Bol, D. K. y Yasbin, R. E. (1991) The isolation, cloning and identification of catalase gene from *Bacillus subtilis*. *Gene.* 109: 31-37.

-Bol, D. K. y Yasbin, R. E. (1994) Analysis of the dual regulatory mechanisms controlling expression of vegetative catalase gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176: 6744-6748.

-Bonaventura, J., Schroeder, A y Fang, S (1972) Human erythrocyte catalase: an improved method of isolation and a reevaluation of reported properties. *Arch. of Biochem.* 150: 606-617.

-Brock, T. (1961) Milestones in microbiology. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. p. 20-25.

- Chary, P. y Natvig, 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.
- Chir, J. T., Loewen, P. C., Gennis, R. B., y Timkovich, R. (1989) Proposed structure for the prosthetic group of the catalase HPII from *Escherichia coli*. *J Am. Chem. Soc.* 11: 7046-7050.
- Claiborne, A., y Fridovich, I. (1974) Purification of the o-dianisidina peroxidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254: 4245-4252.
- Claus, D., y Fritze, D. (1989) Taxonomy of *Bacillus*. En Harwood, C. (ed.) *Bacillus*, vol.2, Plenum Press. p. 5-7.
- Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404-407.
- Deisseroth, A. y Dounce, A. (1970) Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol. Rev.* 50, 391-373.
- Doi, R. H. (1969) Changes in nucleic acids during sporulation. En Gould, G. W. y Hurst, A. (ed.) *The bacterial spore.* vol., 2, Academic Press, London. p. 125-162.
- Doi, R. H. (1989) Sporulation and germination. En Harwood, C. (ed.) *Bacillus*. Plenum Press. p. 169-213
- Dounce, A. (1983) A proposed mechanism for the catalytic action of catalase. *J. Theor. Biol.* 105: 553-567.
- Dworkin, M. (1985) Developmental Biology of the Bacteria. The Benjamin/Cummings Publishing Company. p. 33-47.
- Escamilla, J. E., Ramirez, R., Del Arenal, P. y Aranda, A. (1986) Respiratory systems of the *Bacillus cereus* mother cell and forespores. *J. Bacteriol.* 167: 544-550.
- Farr, S. B. y Kogoma, T. (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* Dec, 561-585
- Fowler, T., Rey, M. W., Vaha-Vahe, P., Power, S. D. y Berka, R. M. (1993) The *catR* gene encoding a catalase from *Aspergillus niger*: primary structure and elevated expression through increased gene copy number and use of a strong promoter. *Mol. Microbiol.* 9: 989-998.

-Freese, E. (1981) Initiation of bacterial sporulation. En Levinson, H., Sonenshein, A. L., y Tipper, D. J. (ed.) Sporulation and germination. American Society of Microbiol. p. 1-12.

-Freese, E. y Heinze, J. (1983) Metabolic and genetic control of bacterial sporulation. En Levinson, H., Sonenshein, A. L. y Tipper, D. J. (ed.) Sporulation and Germination. American Society of Microbiology. p. 101-172

-Gould, G. W. (1983) Mechanisms of resistance and dormancy. En Hurst, A. y Gould, G. W. (ed.) The Bacterial spore. vol., 2, Academic Press. p. 173-209.

-Halliwell, B. y Gutteridge, M. C. (1989) Free radicals in Biology and Medicine. 2a. ed., Clarendon Press. p. 8-177.

-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. (1979) The physiology and diversity of bacterial endospores. En Parish, H. (ed.) Developmental biology of prokaryotes. Capitulo III. Univ. of California Press. p. 35-47.

-Hanson, R. S., Srinivasen, V.R., y Halvorson, H.O. (1963) 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. p. 1-2.

-Harwood, C. (1989) Introduction to the Biotechnology. En Harwood, C. (ed.) *Bacillus*, vol. 2, p. 1-4.

-Hashimoto, T., Friben, W. R. y Conti, S. F. (1969) Microgermination of Bacillus cereus spores. *J. Bacteriol.* 100: 1385-1392.

-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.

-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.

-Jacob, G. S., y Orme-Johnson, W. H. (1979). Catalase of Neurospora crassa L. Induction, purification and physical properties. *Biochemistry* 18: 2967-2975.

-Jungmann, J., Reins, H. A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D. y Jentsch, S. (1993) MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent

transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J.* **12**: 5051-5056.

-Keinan, A., Erenchik, Z., Halvorson, H. O. y Hastings, J. W. (1964) Activation of bacterial endospores. *J. Bacteriol.* **88**: 196-201.

-Kono, Y. y Fridovich, I. (1983) Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* **258**: 6015-6019.

-Loewen, P. C. y Switala, J. (1986). Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12. *Biochem. Cell. Biol.* **64**: 683-646.

-Loewen, P. C. y Switala, J. (1987)¹ Genetic mapping of *katA*, a locus that affects catalase I levels in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 5948-5851.

-Loewen, P. C. y Switala, J. (1987)² Multiple catalases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 3601-3607.

-Loewen, P. C. y Switala, J. (1987)³ Purification y characterization of catalase I from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cell. Biol.* **65**: 939-947.

-Loewen, P. C. y Switala, J. (1988) Purification and characterization of spore-specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cel. Biol.* **66**: 707-714.

-Loewen, P. C., Switala, J. y Triggs, B. L. (1985) Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**: 144-149.

-Loewen, P. C. y Triggs, B. L. (1984) Genetic mapping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **160**: 668-675.

-Love, P. E. y Yashin, R. E. (1984) Genetic characterization of inducible SOS-like system of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **160**: 910-920.

Lowry, O. H., Rosenborough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

-Lutkenhaus, J. (1994) Asymmetric septation in *Bacillus subtilis*. En Piggot, P., Moran, C. P. y Youngman, P. (ed.) Regulation of bacterial differentiation. American Soc. for Microbiol. p. 95-111.

-Markwell, M, A, K., Hass, S. M., Tolbert, N. E. y Bieber, L. L. (1981) Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. En Lowenstein, S. M. (ed.) Methods in Enzimology. vol. 72. Lowenstein, S. M. (ed.). Academic Press. p. 296-303.

- Matz, L.L., Cabrera, B. y Gerhardt, P. (1970) Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **101**: 196-201.
- Navarro, G. R., Stringer, M. A., Hansberg, W., Timberlakem W. E. y Aguirre, J. (1986) cat A, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet.* **29** (4): 352-359.
- Ossowski, I., Hausner, G., y Lowen. P. C. (1983) Molecular analysis based on the amino acid sequence of catalase. *J. Mol. Evol.* **37**: 71-76.
- Perry, J. B. (1994) Systems for polyacrilamide gel electrophoresis. En William, B. J (ed.) *Enzyme purification and related techniques*. p. 237-255.
- Piggot, P. J., Bylund, J. E., y Higgins, M. L. (1994) Morphogenesis and gene expression during sporulation. En Piggot, P., Moran, C. P. y Youngman, P. (ed.) *Regulation of bacterial differentiation*. American Society of Microbiol. p. 113-137.
- Priest, F. G. (1989) Products and Applications. En Harwood, C. (ed.) *Bacillus*, vol. 2, p. 293-320.
- Redinbaugh, M. G., Sabre, M. y Scandafios, J. G. (1990) Expression of the maize *Cat3* catalase gene is under the influence of a circadian rhythm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6853-6857.
- Rorth, M., y Jensen, P. K. (1967) Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. *Biochim. Biophys. Acta.* **139**: 171-173.
- Scott, I. R., y Ellar, D. J. (1978) Study of calcium dipicolinate release during bacterial spore germination by using a new, sensitive assay for dipicolinate. *J. Bacteriol.* **135**: 133-137.
- Setlow, P. (1981) Biochemistry of bacterial forespore, development and spore germination. En Levinson, H., Sonenshein, A. L. y Tipper, D. J. (ed.) *Sporulation and germination*. American Society of Microbiol. p. 13-28
- Setlow, P. (1983) Germination and outgrowth. En Hurst, A., y Gould, G. W. (ed.) *The bacterial spore*, vol., 2. Academic Press. p. 211-254
- Sharma, K. D., Anderson, L., Loehr, T., Termer, J., y Goff, H. (1989) Comparative spectral analysis of mammalian, fungal and bacterial catalases. *J. Biol. Chem.* **22**: 12772-12779.
- Sharp, R. J., Scawen, D. M. y Atkinson, T (1989) Fermentation and downstream processing of *Bacillus*. En Harwood, C. (ed.) *Bacillus*, vol, 2. p. 255-292

-Schuller, C., Brewster, J.L. Alexander, M. R., Gustin, M. C. y Ruis, H. (1990)
The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J.* **13**: 4382-4389.

-von Ossowski, I., Mulvey, M. R., Leco, P. A., Borys, A. y Loewen, P.C. (1991)
Nucleotide sequence of *Escherichia coli* katE, which encodes catalase HPII. *J. Bacteriol.* **173**: 514-520.

-Zitomer, R. S. y Lowry, C. V. (1992) Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **56**: 1-11.