

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
SEDE ARAGUA**



**COMPARACIÓN DEL EFECTO MITOGÉNICO EN *Escherichia coli* DE LA
INSULINA MODIFICADA LISPRO Y LA HORMONA DE SECUENCIA
REGULAR HUMULIN**

**Trabajo de Investigación presentado como
requisito para ascender a la categoría de Prof.
Asistente por:**

Prof. Gil Torres Alexander J.

Tutora:

Profa. Triana Juana L.

Morita II, Enero de 2015

Comparación del efecto mitogénico en *Escherichia coli* de la insulina modificada Lispro y la hormona de secuencia regular Humulin

RESUMEN

En este trabajo se analizó la capacidad mitogénica de la insulina modificada Lispro (Humalog) sobre la cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* en forma comparativa con la insulina de secuencia regular (Humulin). Los cultivos se realizaron en medio Luria Bertani (LB) con diversas concentraciones de las insulinas comerciales (0,1-2,0 UI/mL) y glucosa (1-5 mM). El crecimiento celular se siguió por A₆₀₀ o conteo de células. Ambas insulinas, entre 0,1 y 1 UI/mL, estimularon el crecimiento con diferentes intensidades, observándose el máximo efecto a 0,5 UI/mL: 60 % Humulin y 51% Humalog en las fases logarítmica temprana y prelogarítmica respectivamente, además, Humalog tuvo 1,6 veces mayor velocidad inicial de proliferación, que indica una acción más rápida y mayor capacidad mitogénica. La glucosa inhibió la proliferación bacteriana en LB (25-35 % para 1 y 2 mM, 40 % para 5 mM en la fases prelogarítmica o logarítmica temprana), que sugiere un mecanismo de represión catabólica por acción del carbohidrato. Este efecto fue revertido por Humulin de manera dependiente de la glucosa (máximo estimulador entre 70-90% sobre el control), con Humalog la inhibición dejó de tener efecto solo con la mayor concentración de glucosa (estimulación de 30 % después de la etapa logarítmica media). Las hormonas parecen favorecer la acción de la glucosa en las células bacterianas, y la principal diferencia posiblemente radique en su capacidad para actuar sobre la reorganización del flujo metabólico central o entre la actividad gluconeogénica y glucolítica. Humalog parece tener mayor potencia para actuar sobre una vía metabólica y esto originaría mayor dificultad para la reorganización del flujo metabólico hacia otra ruta de señalización. Los resultados sugieren que microorganismos responsables de enfermedades infecciosas en pacientes con DM podrían ser estimulados a crecer por los tratamientos hormonales, incluyendo Humalog.

Palabras clave: *E. coli*, insulina, crecimiento bacteriano.

INTRODUCCIÓN

La insulina de mamíferos es una hormona peptídica formada por dos cadenas (A y B), secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas y regula la expresión de una gran cantidad de genes relacionados con los procesos de transporte e incorporación de glucosa a las células, glucogénesis, glucólisis, lipogénesis, y los involucrados en el control del crecimiento y diferenciación celular (Kim y Novak, 2007; Choi y Kim, 2010; Low y cols., 2013). Una deficiencia en la producción o secreción de insulina, y/o la baja sensibilidad de las células blanco a la acción de la hormona producen la enfermedad conocida como Diabetes Mellitus (DM). La Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) y la tipo 2 (DM2) son las más prevalentes, e independientemente del tipo de enfermedad, la característica principal es la hiperglicemia sanguínea (ADA, 2009; Bi y cols., 2012; OMS 2013; Brunetti y cols., 2014). La patología a largo plazo origina el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, respiratorias, infecciones generalizadas (pie diabético), daños renales, cerebrales y oculares (Ipriani y Quintanilla, 2010; Olokoba y cols., 2012; Pedro-Boet y Nuñez-Cortés, 2014). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que para el año 2030 esta enfermedad se convierta en la séptima causa de muerte a nivel mundial. En la actualidad, se reconoce a la DM como una de las enfermedades crónicas no transmisibles más comunes en la sociedad contemporánea, responsable de ser una de las cinco primeras causas de muerte en la mayoría de los países desarrollados. En Venezuela también está tipificada como la quinta causa de muerte (MSDS, 2011; Bonvecchio y cols., 2011).

Los tratamientos aplicados en la DM (diversos fármacos e insulina humana obtenida por ADN recombinante) tienen como objetivo final tratar de compensar la deficiencia de insulina o de su acción. Para alcanzar ese objetivo es necesario conocer los mecanismos de regulación genética de la hormona, que hasta los momentos no han sido del todo aclarados. En este sentido, se han empleado diversos sistemas celulares humanos y de ratones, aunque siempre han tenido la desventaja de su difícil obtención, manipulación y mantenimiento (Rakatzi y cols., 2003; Martínez, 2011). Algunos estudios sobre la variación hormonal en la cadena evolutiva determinaron que ciertos microorganismos, como los hongos y

bacterias, respondían a la insulina humana de manera similar a como lo hacen las células de mamíferos. Dicha capacidad parece tener relación con la variación a través del tiempo de sustancias antecesoras y parecidas estructuralmente a la insulina detectadas en diferentes hongos y bacterias, además de poseer la misma funcionalidad que la hormona humana (Le Roith y cols., 1981; Berdicevsky y Mirsky, 1994; Ferreira y López, 2004). Estos resultados convirtieron a los microorganismos que responden a la insulina como sistemas celulares ideales para estudiar sus efectos moleculares. Las ventajas estarían representadas por su fácil obtención y manipulación. Se ha demostrado que diversos hongos y bacterias en presencia de la hormona aumentan el crecimiento celular, la incorporación de glucosa y formación de glucógeno, la actividad de enzimas de la vía de la glucólisis, variación en productos de excreción y la resistencia a fármacos (Müller y cols., 1998; Ploktin y Viselle, 2000; Camargo y Bastidas, 2002; Reggio y cols., 2002; Guaderrama y Cabrera 2005; Tuntunji y Vera, 2005; Figuera y García, 2007; Gámez y González, 2008; Hernández y cols., 2008; Triana y cols., 2008; Anzola y Bello, 2011; Haskur y Makal, 2011; González y cols., 2011; Triana y cols., 2011; Sarco-Lira, 2012).

Uno de los aspectos importantes del estudio del efecto de la insulina en microorganismos es la resistencia que la hormona le confiere a ciertos antimicóticos y antibióticos y la posible relación de este hecho con la severidad y resistencia de las infecciones en pacientes diabéticos (Tuntunji y Vera, 2005); Gámez y González, 2008; Triana y cols., 2008; Haskur y Makal, 2011). Los individuos que padecen la patología pueden tener estados de hiperinsulinemia originados por los tratamientos con insulina y fármacos que aumentan su producción o por la hormona endógena, principalmente en los inicios de la DM2, donde hay un aumento en la producción de insulina como una forma de compensar la resistencia de las células blanco a su acción (ADA, 2009; OMS 2013). Esta condición sobre el descontrol hormonal y los cuadros de hiperinsulinemia que padecen los pacientes diabéticos podrían causar un efecto directo en la proliferación de microorganismos y resistencia a fármacos, aumentando así la severidad de las infecciones. Las diversas investigaciones no han mostrado hasta los momentos resultados definitivos sobre dicha relación.

Otro aspecto importante del uso de microorganismos para estudiar los efectos de la insulina humana es el relacionado con las diversas presentaciones comerciales de la hormona usadas en los tratamientos. En el mercado se encuentra la insulina regular que tiene la secuencia humana exacta, pero tiene el inconveniente de formar hexámeros, lo que resulta en una absorción lenta por los tejidos, y además, debe convertirse a monómeros para ser activa en el enlace con el receptor (Baker y cols., 1988; Adnan, 2007; Sáez y cols., 2008). Por esa razón, se han diseñado una cantidad de insulinas análogas o modificadas en la región carboxi-terminal de la cadena B con variación de su farmacocinética, que tienen la característica de no formar agregados, aumentando de esta forma su absorción, sobre todo después de las comidas donde hay un aumento de la glicemia circulante. Una de estas insulinas de acción rápida ampliamente utilizada en la DM es la Lispro (Humalog) (Baker y cols., 1988; Clausen y cols., 2002; Lüddecke, 2007; Nathan y cols., 2009; ADA, 2011; Licea, 2014; Adnan, 2014).

La insulina Lispro posee un cambio de secuencia en dos aminoácidos (Pro(β 28) por Lys y Lys(β 29) por Pro) y las indicaciones dicen que su potencia es equivalente con base molar a la insulina regular humana (Humulin-Cristalina), pero hay reportes donde su uso continuo ha originado una gran cantidad de patologías que parecen relacionadas con las modificaciones: la resistencia a la hormona como consecuencia de reacciones inmunológicas (Fineberg y cols., 2003), la lipoatrofia (Griffin y cols., 2001) y vitiligo, una enfermedad asociada con el hiperinsulinismo y caracterizada por la despigmentación de la piel (Burge y Carey, 2004). Igualmente, otras investigaciones han analizado la potencia metabólica y mitogénica de los diferentes análogos de insulina, y los resultados muestran un aumento de la afinidad por el receptor de la hormona y por el receptor del factor de crecimiento 1 (IGF-1), que se correlaciona con un estímulo de la actividad mitogénica de estas insulinas (Hansen y cols., 1996; Kristensen y cols., 1997; Slieker y cols., 1997; Brange y Vølund, 1999; Rakatzi y cols., 2003). Por otra parte, también se ha establecido una posible asociación entre la DM2, el uso de insulinas análogas y el incremento en la incidencia de varios tipos de cánceres (colon, endometrial y de mama), indicando que una simple sustitución en la secuencia de aminoácidos de la molécula de insulina puede tener implicaciones importantes Hansen y cols., 1996; Kristensen y cols., 1997; Slieker y cols.,

1997; Brange y Vølund, 1999; Xu y cols., 2014). Un estudio en células leucémicas humanas U937, demostró que Lispro parece tener sinergia con factores séricos para inducir la proliferación y supervivencia de células malignas (Martínez, 2011). Sin embargo, hasta los momentos no hay datos suficientes para establecer alguna contraindicación del uso de las insulinas análogas.

Los sistemas microbianos serían ideales para estudiar con detalle las diferencias de los efectos de las insulinas comerciales y obtener conclusiones sobre su repercusión en las células de mamíferos, y en última instancia, en los tratamientos aplicados a los pacientes diabéticos con dichas hormonas, permitiendo establecer posibles mecanismos correctivos. Por otra parte, usando microorganismos también se observaría el efecto de las diferentes insulinas sobre la resistencia a fármacos antimicrobianos, y se podrían establecer posibles relaciones entre la severidad de las infecciones en los pacientes diabéticos y los tratamientos aplicados con las distintas insulinas. En este sentido, recientemente se reportó que el parásito *Echinococcus multilocularis* estimulaba su crecimiento con la insulina del hospedador y la identificación del receptor permitió obtener anticuerpos anti-receptor que inhibieron el efecto del crecimiento del parásito (Hemer y cols., 2014).

Hasta los momentos no se ha realizado ningún estudio en sistemas bacterianos con insulinas análogas. Un sistema ideal sería el de *Escherichia coli* (bacilo Gramnegativo, familia de las Enterobacteriaceae), ya que es de fácil cultivo, crece eficientemente en los medios de uso común y se conoce completamente su composición genética. Las investigaciones realizadas con *E. coli* han demostrado que la insulina de secuencia regular estimula su crecimiento, la expresión de algunos genes y la resistencia a antibióticos (Plotkin y Viselle, 2000; Triana y cols., 2008; Haskur y Makal, 2011; González y cols., 2011).

Considerando que no hay estudios sobre el efecto de insulinas análogas en bacterias, en este trabajo se analizó la capacidad mitogénica de la insulina comercial Humalog de forma comparativa con la hormona de secuencia regular en una cepa de referencia de *Escherichia*

coli. El estudio se realizó bajo diferentes condiciones del medio de cultivo para simular las distintas condiciones de nutrientes que guardan relación con las rutas específicas intracelulares activadas por la insulina en las células de mamíferos. Los resultados obtenidos servirán de base para futuras investigaciones sobre los mecanismos moleculares de la actividad mitogénica entre ambas insulinas, un aspecto que es importante en los tratamientos aplicados en la DM, y para investigaciones en cepas bacterianas aisladas de infecciones en pacientes diabéticos y la resistencia a fármacos por efecto de las diferentes insulinas comerciales.

METODOLOGÍA

1. Cultivo celular

Todos los ensayos se realizaron con la cepa de referencia ATCC 25922 de *Escherichia coli*, proveniente del Instituto Nacional de Higiene y cultivada en medio líquido Luria-Bertani (LB). Para cada experimento se prepararon 25 mL de un preinóculo (pre-cultivo) fresco en medio LB, donde se inocularon 25 μ L de una suspensión de bacterias criopreservadas que fueron crecidas hasta fase estacionaria. Este pre-cultivo se incubó en condiciones aeróbicas a 37 °C con agitación constante, por un lapso aproximado de 15 h (González y cols., 2011).

Para garantizar la homogeneidad del número de células iniciales en todos los ensayos se siguió el siguiente procedimiento: con base a la absorbancia a 600 nm (A_{600}), determinada en un espectrofotómetro Beckman (DU 650) y el número de células por mL determinadas en una cámara de Neubauer del pre-cultivo fresco, se calculó la cantidad necesaria a tomar para inocular una fiola madre que contenía 25 ml de medio LB y obtener una A_{600} de 0,05 ($\sim 590 \times 10^5$ células/mL). Posteriormente, se dispensó un 1 ml de la suspensión bacteriana en tubos de ensayos estériles para realizar los distintos cultivos. Este método garantizó la mayor homogeneidad en el número de células iniciales en el medio de cultivo.

Para determinar el efecto de la insulina sobre el crecimiento bacteriano, se agregaron a los tubos de ensayo previo a la inoculación de las bacterias diferentes cantidades de las insulinas (Humilin®) y Lispro (Humalog), marca comercial Lilly, para obtener las concentraciones finales de: 0,1; 0,5; 1 y 2 UI/mL (González y cols., 2011). Igualmente, se analizó el efecto sobre el crecimiento celular de diferentes cantidades de glucosa en el medio LB a las concentraciones finales de: 1, 2, 5, y mM. Por otro lado, también se analizó el efecto de las hormonas en presencia de las diferentes concentraciones de glucosa. Todos los ensayos se hicieron con los respectivos controles.

Los cultivos se llevaron a cabo a 37 °C en condiciones aeróbicas y con agitación constante a 250 rpm y el crecimiento celular se determinó midiendo la A_{600} y/o conteo de

células de los mismos a intervalos de 20 minutos durante los primeros 60 minutos del ensayo, y luego cada 30 minutos hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria del crecimiento. Con los datos de A_{600} , el número de células y el tiempo, se construyeron las curvas de crecimiento para realizar los respectivos análisis.

2. Análisis de datos

Los datos que se obtuvieron de los ensayos fueron organizados y expresados en valores absolutos, utilizándose la media aritmética para obtener los valores promedios del efecto de las insulinas de cada ensayo. Con los datos obtenidos se estimaron las diferencias absolutas y porcentuales de A_{600} entre los cultivos en presencia de los dos tipos de insulina, de glucosa y de los controles, durante diferentes tiempos del crecimiento bacteriano. El diseño de todas las gráficas se llevo a cabo mediante la utilización del programa EXCEL de Microsoft (versión 2010).

Para verificar las diferencias significativas en la capacidad mitogénica de las insulinas en las diferentes condiciones de crecimiento, se realizó el análisis de varianza (ANAVAR) y se utilizó la prueba de múltiples comparaciones contra el control de Dunnett. Para la comparación entre las insulina se usó la Prueba t de Student. Los análisis se hicieron utilizando el software Statistix 8.0 para Windows.

RESULTADOS

Efecto de las insulinas humanas sobre el crecimiento de *E. coli* en medio líquido Luria Bertani

Para determinar el efecto de las insulinas sobre el crecimiento de *E. coli* en medio líquido LB, los cultivos se realizaron en presencia de las diferentes concentraciones de las hormonas indicadas en la metodología y se registró el número de células y/o la A_{600} de los mismos durante un lapso de 330 minutos. En la Figura 1A se muestra un ejemplo de las curvas de crecimiento del control sin las hormonas y en presencia de 0,5 UI/mL de las insulinas comerciales.

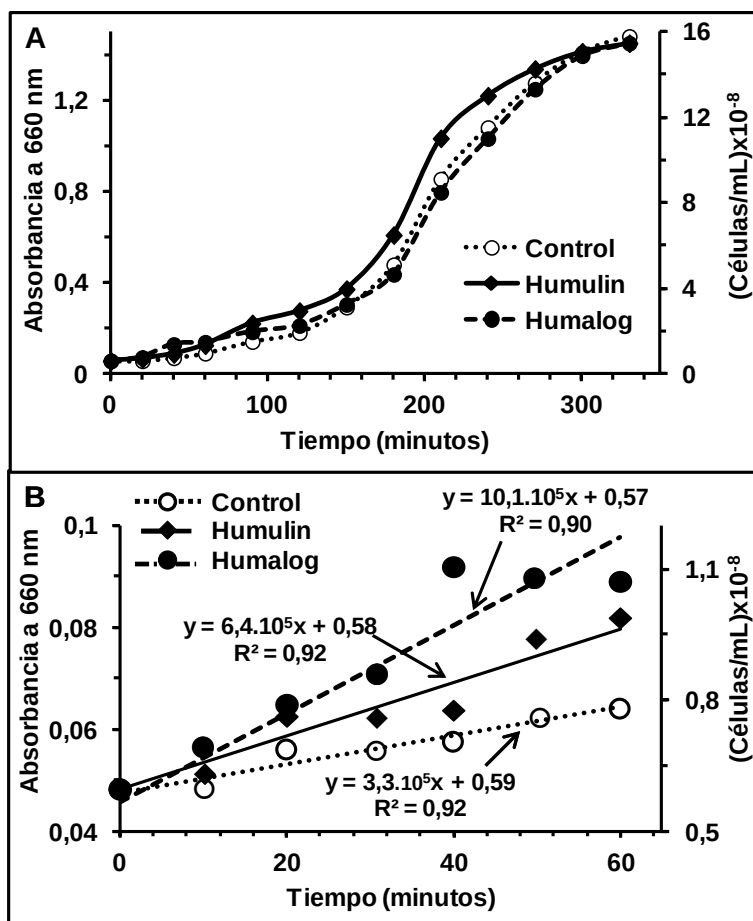


Figura 1. Efecto de las insulinas comerciales sobre el crecimiento de *E. coli* en medio líquido Luria Bertani. Cultivos de *E. coli* ajustados a una concentración inicial de bacterias de $0,05 A_{600}/\text{mL}$ (596×10^5 células/mL) fueron incubados en ausencia (Control) y en presencia de 0,5 UI/mL de las insulinas humanas, bajo las condiciones que se indicaron en la Metodología. (A) Curvas de crecimiento bacteriano del control y con las insulinas indicadas. (B) Parte inicial de las curvas de crecimiento. Se indica la ecuación de la recta en cada caso, cuya pendiente [$(\Delta \text{células/mL})/\text{min}$] es la velocidad inicial de crecimiento bacteriano.

En el cultivo que contenía a Humulin, el crecimiento de la bacteria fue apreciablemente mayor que en el control durante las diferentes fases de la curva, alcanzando un nivel de crecimiento aproximadamente equivalente en la fase estacionaria (> 270 minutos). Con la hormona modificada Humalog, la curva de crecimiento fue semejante a la del control y las diferencias se observaron en la fase prelogarítmica (0-60 minutos) y logarítmica temprana (60-150 minutos). En la Figura 1B se aprecian dichas diferencias al representar la zona inicial de las curvas de crecimiento. La velocidad inicial de proliferación con Humalog ($10,1 \cdot 10^5$ (células/mL)/min) fue aproximadamente tres veces superior a la del cultivo control ($3,3 \cdot 10^5$ (células/mL)/min) y con la hormona de secuencia regular fue alrededor de 2 veces superior al control ($6,4 \cdot 10^5$ (células/mL)/min), a su vez, Humalog produjo alrededor de 1,6 veces mayor velocidad inicial de proliferación que Humulin.

Para apreciar claramente los efectos de las hormonas, en la Figura 2A y 2B se representan los porcentajes de crecimiento respecto al control para las diferentes concentraciones ensayadas de las insulinas Humulin y Humalog respectivamente, y los valores fueron registrados durante las diferentes etapas del crecimiento. Los resultados indican un incremento en la proliferación de *E. coli* por efecto de las hormonas, el cual es dependiente de su concentración. Los cultivos que contenían concentraciones de insulina entre 0,1 y 1 UI/mL, presentaron el mayor crecimiento, con el máximo en 0,5 UI/mL para ambas hormonas y una estimulación respecto al control alrededor de 60 % para Humulin y 51 % para Humalog. En el caso de la hormona modificada (Figura 2B), esta estimulación máxima fue observada aproximadamente entre 20 y 60 minutos del cultivo celular y correspondió a la fase prelogarítmica del crecimiento bacteriano. Dicha estimulación disminuyó en la fase logarítmica temprana (60-150 minutos) y alcanzó valores alrededor del control a partir de los 150 minutos de iniciado el cultivo. Sin embargo, para Humulin (Figura 2A) el máximo efecto estimulador sobre el control se observó un poco más avanzado el tiempo del cultivo y correspondió a la fase logarítmica temprana (60-150 minutos). Este efecto se extendió por toda la fase logarítmica media (150-210 minutos) y tardía (210-270 minutos), pero con una disminución de la intensidad estimuladora, desapareciendo dicho efecto en la fase estacionaria (> 270 minutos). En presencia de 2

UI/mL de cualquiera de las dos hormonas se obtuvo la menor estimulación y con Humalog el crecimiento fue igual o menor al control, lo que indica que a concentraciones altas de las insulinas el efecto estimulador sobre la proliferación celular disminuye.

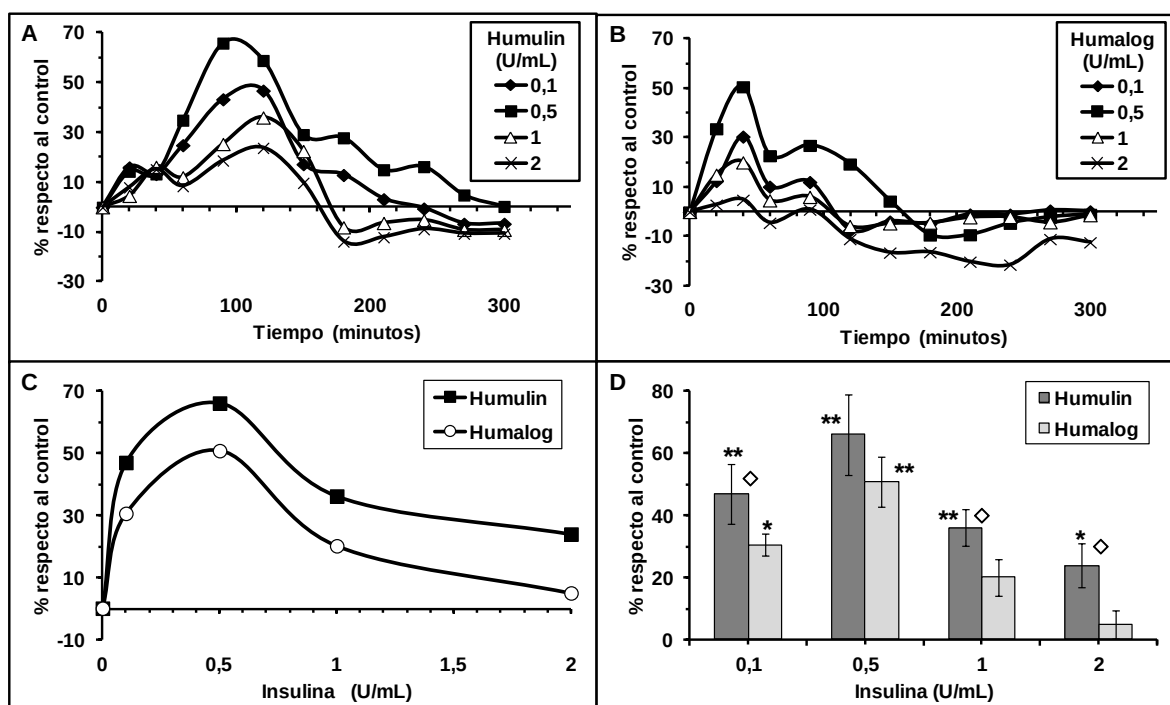


Figura 2. Efecto de las diferentes concentraciones de las insulinas comerciales sobre el crecimiento de *E. coli* en medio líquido Luria Bertani. En cada caso se representa el porcentaje de crecimiento bacteriano con las diferentes concentraciones de las insulinas comerciales (0,1-2 U/mL) respecto al control sin las hormonas ($\% = [(A_{600\text{insulina}} - A_{600\text{control}}) \times 100] / A_{600\text{control}}$). Porcentajes durante las curvas de crecimiento en presencia de: (A) Humulin y (B) Humalog. (C) Porcentajes de máxima estimulación con las hormonas frente al control. (D) Promedios con la desviación estándar de los porcentajes de máxima estimulación con las hormonas frente al control. Los datos corresponden a 6 ensayos independientes. Prueba de múltiples comparaciones con el control de Dunnett: ** $P < 0,0001$; * $P < 0,05$. Prueba T: $\diamond P < 0,05$ para la comparación entre Humulin y Humalog a cada concentración sobre el efecto en el crecimiento bacteriano.

En la Figura 2C se muestran los promedios de los porcentajes de las máximas estimulaciones respecto al control obtenidos en las curvas de crecimiento bacteriano para las diferentes concentraciones de las hormonas. La tendencia de estimulación por las distintas concentraciones de ambas insulinas es semejante, observándose que el intervalo de concentración donde las hormonas ejercen sus efectos se encuentra aproximadamente entre de 0,1 y 1 UI/mL. La diferencia principal fueron los valores inferiores de estimulación máxima observados con Humalog respecto a Humulin para todas las concentraciones ensayadas, y en la Figura 2D se muestra que para las concentraciones de 0,1; 1 y 2 UI/mL

de Humalog, los valores de estimulación fueron significativamente inferiores a los detectados con Humulin. Con la concentración de máxima estimulación de ambas insulinas (0,5 UI/mL), no se observaron diferencias significativas entre las dos hormonas. Por otro lado, el máximo crecimiento bacteriano con cualquiera de las concentraciones de Humulin fue significativamente superior respecto al control, mientras que con Humalog solo las concentraciones de 0,1 y 0,5 UI/mL (Figura 2D) produjeron efectos en la proliferación celular significativamente superiores al control.

Los resultados en general indicaron que en el medio líquido Luria Bertani hay un incremento en la proliferación de *E. coli* por efecto de las hormonas comerciales con algunas diferencias en su acción.

Efecto de las insulinas humanas sobre el crecimiento de *E. coli* en medio líquido Luria Bertani suplementado con glucosa

Se determinó el efecto de las insulinas comerciales variando las condiciones de nutrientes en el medio de cultivo. La variación consistió en agregar diferentes cantidades de glucosa al medio Luria Bertani hasta concentraciones de 1, 2 y 5 mM, como se indicó en la Metodología. En la Figura 3 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos con las dos hormonas a la concentración (0,5 UI/mL) donde se observó el máximo efecto hormonal sobre el crecimiento en el medio Luria Bertani. En primer lugar, se analizó el efecto de la glucosa en el crecimiento bacteriano. La presencia de las diferentes concentraciones de glucosa en el medio de cultivo no ejercieron un efecto estimulador en el crecimiento de esta cepa de *E.coli*, en su lugar, se observaron inhibiciones respecto al control (LB), que alcanzaron valores máximos entre 25-35 % para 1 y 2 mM de glucosa y alrededor de 40 % para 5 mM del carbohidrato (Figura 3, gráficas de Glucosa 1, 2 y 5 mM). Dicha inhibición ocurrió en la fase prelogarítmica o logarítmica temprana del crecimiento con tendencia a disminuir a medida que el cultivo entró en la fase logarítmica media y tardía, y comportándose semejante al control en la fase estacionaria.

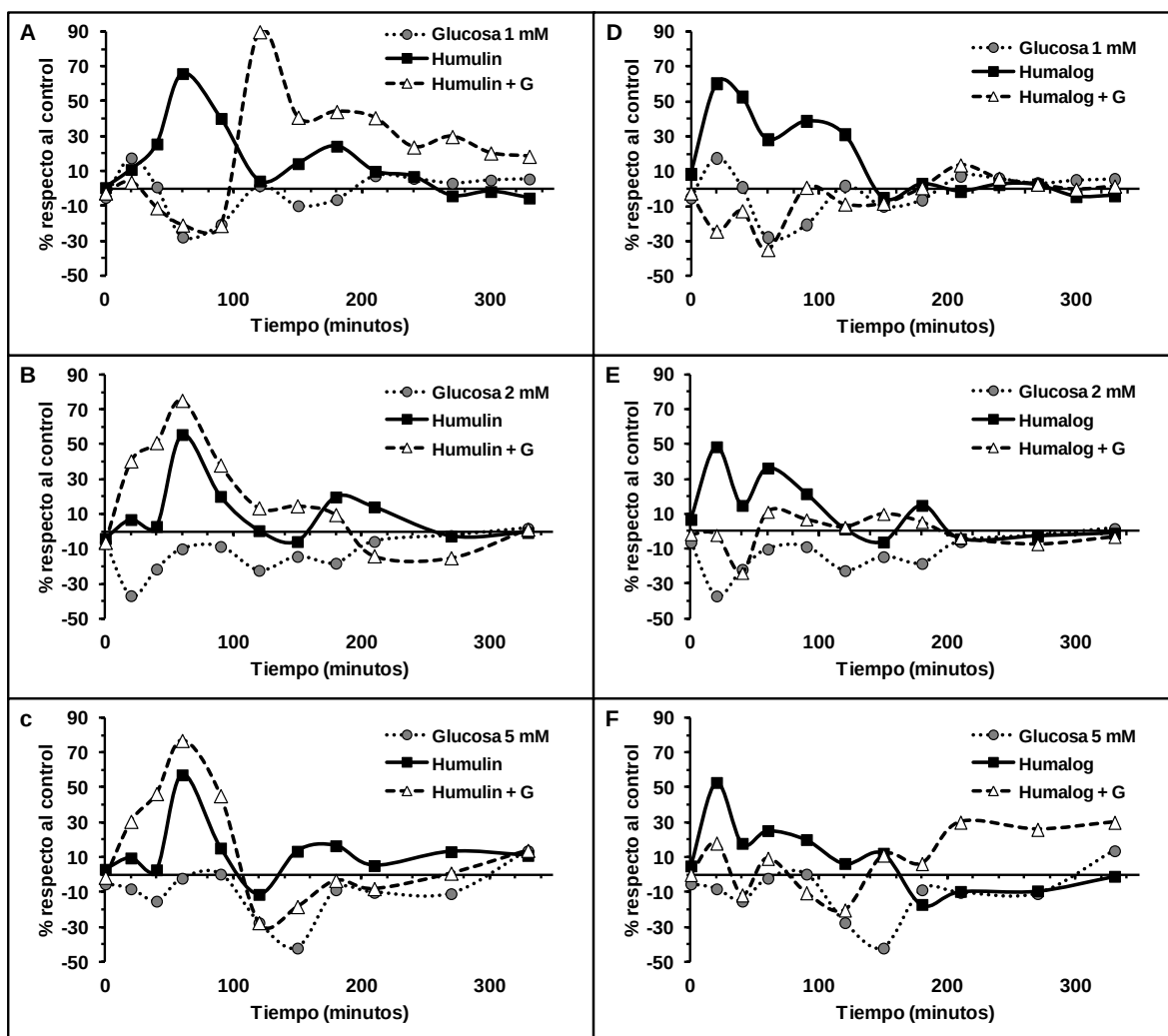


Figura 3. Efecto de las insulinas comerciales sobre el crecimiento de *E. coli* en diferentes concentraciones de glucosa. En cada caso se representa el porcentaje de crecimiento bacteriano respecto al control en medio LB. (A→F) Los cultivos se realizaron en presencia de: Glucosa (1, 2 o 5 mM); 0,5 UI/mL (Humulin o Humalog); 0,5 UI/mL (Humulin o Humalog + Glucosa (1, 2 o 5 mM)).

Al añadir Humulin más glucosa a los medios LB (Figura 3A, B y C), fue evidente que no se detectó el efecto inhibitorio del carbohidrato en la fase temprana de crecimiento, a excepción del ensayo con 1 mM glucosa (Figura 3A). Con esta concentración se produjo una inhibición máxima alrededor del 20 % respecto al control en la fase logarítmica temprana (90 min), para recuperarse luego hasta una estimulación de aproximadamente 90 % respecto al control, el efecto disminuyó a lo largo de toda la fase logarítmica, y el perfil estimulador fue semejante al obtenido únicamente con Humulin en el medio de cultivo, pero desplazado en el tiempo de crecimiento. En la presencia de 2 y 5 mM glucosa más

Humulin se observó una mayor estimulación del crecimiento en relación a los cultivos realizados solo en la presencia de la hormona al inicio de la fase prelogarítmica de crecimiento (20-40 minutos) (Figura 3B y C), alcanzando más tarde (90 minutos) un máximo semejante al que ocasionó la hormona sin glucosa.

Cuando al medio de cultivo conteniendo a Humalog se le añadió glucosa (Figura 3D, E y F) los resultados fueron diferentes a los obtenidos con Humulin. Todas las concentraciones del carbohidrato más Humalog produjeron una disminución de la estimulación del crecimiento en relación a la estimulación que ocasionó la hormona sola en el medio LB. Los porcentajes de proliferación alcanzaron valores inferiores al control (LB) en la etapa prelogarítmica y logarítmica temprana, siendo el patrón de comportamiento cercano al obtenido cuando el medio de cultivo solo contenía glucosa. Es decir, que la presencia de glucosa disminuyó el efecto hormonal, al menos en la etapa temprana del crecimiento. Es importante notar que a la mayor concentración de glucosa (5 mM) y en presencia de la hormona Humalog (Figura 3F), el crecimiento bacteriano tomó valores superiores al control (alrededor del 30 %) en la fase logarítmica tardía (210 minutos) y también superiores a la presencia de únicamente la hormona en el medio o de los cultivos que contenían glucosa solamente. En el caso de Humulin y 5 mM glucosa parece ocurrir todo lo contrario, se observó estimulación respecto al control en las etapas tempranas de las curvas de crecimiento y una inhibición entrando a la fase logarítmica (120 minutos) para luego alcanzar valores alrededor del control como se observa en la Figura 3C.

Los porcentajes respecto al control (medio LB) de máxima variación durante el crecimiento celular de *E. coli* bajo todas las condiciones de nutrientes mostrados en la Figura 3, se resumen en la Figura 4A. La glucosa en el medio LB inhibió significativamente el crecimiento respecto al control (LB) en cierto momento del cultivo, alrededor de 30 % (1 y 2 mM) y 40 % (5 mM). De manera similar, en presencia de Humalog más 1 o 2 mM glucosa, la máxima variación en el crecimiento respecto al control fue significativamente negativa (~35 y 25 % inferior al control respectivamente), e igualmente, fueron significativamente inferiores respecto a los ensayos en presencia de la hormona sin glucosa.

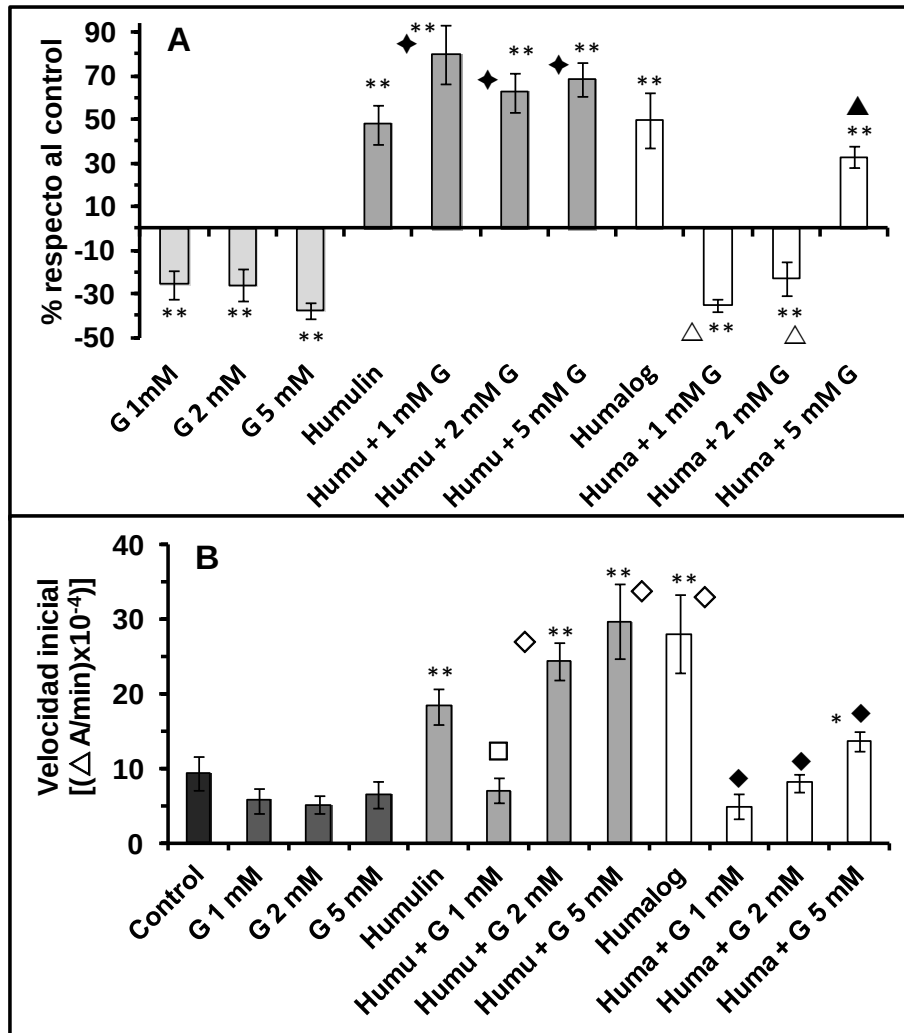


Figura 4. Efectos máximos de las insulinas comerciales sobre el crecimiento de *E. coli* y sobre la velocidad inicial de proliferación en las diferentes concentraciones de glucosa. (A) Porcentaje de máxima variación del crecimiento bacteriano respecto al control en medio LB. (B) Velocidad inicial de crecimiento de *E. coli*. Se representa la velocidad de proliferación bacteriana ($\Delta A_{600}/min$) en la etapa prelogarítmica de la curva de crecimiento. (A) y (B) Se usaron 0,5 UI/mL de las hormonas. G: glucosa. Se indican las diferentes condiciones de los cultivos. Los datos corresponden al promedio de cuatro ensayos independientes con la desviación estándar. Prueba de múltiples comparaciones con el control de Dunnett: ** $P < 0,0001$ y * $P < 0,05$ respecto al control. * $P < 0,05$; $\diamond P < 0,05$ y $\square P < 0,0001$ respecto a los ensayos con Humulin. $\triangle P < 0,0001$; $\blacktriangle P < 0,05$ y $\blacklozenge P < 0,0001$ respecto a los ensayos con Humalog.

En presencia de Humulin, Humulin más las diferentes concentraciones de glucosa, Humalog y Humalog más 5 mM glucosa los cultivos tuvieron como máxima variación respecto al control un efecto estimulador significativo. Por otro lado, también se observa en la Figura 4A que hubo diferencias significativas para la máxima estimulación en el crecimiento entre los ensayos con Humulin y Humulin más las diferentes cantidades de

glucosa. Los resultados muestran claramente la diferencia entre ambas hormonas en cuanto al máximo efecto producido cuando está presente la glucosa.

Los efectos que las hormonas causaron en el momento inicial del crecimiento bacteriano bajo las diversas condiciones de nutrientes, pueden ser importantes para establecer posibles diferencias de acción. En ese sentido, se determinaron las velocidades iniciales de crecimiento celular en la etapa prelogarítmica (Figura 4B). Los ensayos que contenían Humulin más glucosa en las concentraciones de 2 y 5 mM tuvieron una velocidad de crecimiento significativamente superior (24 y $29,7 \times 10^{-4} \Delta A_{600}/\text{min}$, respectivamente) a los cultivos que solo contenían a la hormona ($18 \times 10^{-4} \Delta A_{600}/\text{min}$). Lo contrario se observó con la concentración de 1 mM del carbohidrato ($7 \Delta A_{600}/\text{min}$). En los cultivos con Humalog más glucosa, la velocidad inicial fue significativamente inferior a los cultivos en presencia de la hormona sin el carbohidrato. Los resultados indican que las hormonas actúan con diferencias en cuanto el efecto inicial sobre la proliferación celular.

DISCUSIÓN

En otras investigaciones se ha analizado el efecto de la insulina de secuencia regular en *E coli* (Ploktin y Viselle, 2000; Triana y cols., 2008) y los resultados son semejantes a los encontrados en este trabajo en cuanto a la máxima estimulación en el crecimiento celular. Sin embargo, no hay reportes del efecto de hormonas modificadas utilizadas en los tratamientos de la Diabetes mellitus, como es el caso de Humalog. En este trabajo se demostró que la insulina con el cambio de prolina por lisina en la posición 28, y de lisina por prolina en la posición 29 de la cadena beta, es capaz de estimular el crecimiento bacteriano en el medio LB de manera similar a como lo hace la hormona de secuencia regular y en cierto intervalo de concentración (alrededor de 0,5 UI/mL). La principal diferencia observada en este medio fue el tiempo de acción de ambas hormonas (Figura 2A y B). La insulina de secuencia regular tuvo su máximo efecto estimulador en el crecimiento bacteriano en la fase logarítmica temprana y este efecto continuó con menor intensidad a lo largo de toda la fase logarítmica. La insulina Humalog tuvo su máxima acción en la etapa prelogarítmica del crecimiento y el efecto desapareció en la fase logarítmica temprana, es decir, su acción fue más rápida que la insulina de secuencia regular, además de aumentar la velocidad de proliferación inicial en relación a Humulin (Figura 1B). Aún con las diferencias, esto indica que la acción estimulante sobre el crecimiento celular de ambas hormonas es prolongada y persiste por varias generaciones, bien sea directamente o a través de un mecanismo que es activado al principio y luego persiste durante todo el crecimiento. Esta forma de acción de las hormonas sobre el crecimiento bacteriano posiblemente guarde relación con la manera en que las insulinas actúan en las células eucariotas para la incorporación de glucosa. Las hormonas modificadas no permiten la formación de agregados insulínicos y su interacción con el receptor y acción es más rápida (Licea, 2014; Adnan, 2014).

De los resultados también se deduce que Humalog en relación a Humulin, tiene mayor carácter mitogénico sobre las células bacterianas, debido a su acción más rápida. Con un suministro continuo de nutrientes y de hormonas, habrá en un tiempo dado en el medio un mayor número de células con Humalog. Esta característica es similar a los

reportes en eucariotas superiores sobre la potencia metabólica y mitogénica de los diferentes análogos de insulina, y relacionada con su aumento de afinidad por el receptor de la hormona y por el receptor del factor de crecimiento 1 (IGF-1) (Hansen y cols., 1996; Kristensen y cols., 1997; Slieker y cols., 1997; Brange y Vølund, 1999; Rakatzi y cols., 2003), así como la incidencia de varios tipos de cánceres (colon, endometrial y de mama), (Hansen y cols., 1996; Kristensen y cols., 1997; Slieker y cols., 1997; Brange y Vølund, 1999; Xu y cols., 2014). Hasta los momentos no se han reportado receptores hormonales en bacterias, sin embargo, en la levadura *S. cerevisiae* se encontró un complejo proteico de membrana que es sensible a la insulina humana y actúa de manera similar al de eucariotes superiores e interviene en el metabolismo de carbohidratos (Müller y cols., 1998). Por analogía, en bacterias como *E. coli* que responden a la insulina debería existir algún componente a nivel de membrana donde la hormona ejerza su interacción y se activen señales intracelulares. El hecho de observarse una disminución de la estimulación o de inhibición respecto al control al aumentar la cantidad de insulina en el medio (1 y 2 UI/mL) (Figura 2) indica la posibilidad de sobresaturación de receptores con la consecuente inhibición de la señal. Este efecto es más notorio con Humalog, lo cual se explicaría por su mayor facilidad de interacción con dichos receptores. Igualmente, el fenómeno de efecto estacionario de estimulación a dosis mayores, en este caso alrededor de 0,5 UI/mL, es similar al observado para las curvas de cinética enzimática, donde se alcanza una velocidad máxima correspondiente al punto de saturación de la enzima por su sustrato. Se podría inferir entonces que la célula de *E. coli* posee receptores para la hormona con un nivel de saturación correspondiente a una concentración de insulina aplicada al medio. Sin embargo, esta es una hipótesis por comprobar.

El hecho de que la señal de las insulinas persista en el tiempo y de que tenga una característica de pulsos estimulatorios (Figura 2A y B), podría indicar algún tipo de efecto secundario, además del efecto directo que se observa en la estimulación inicial al entrar en contacto las hormonas con las células bacterianas. Estos mecanismos secundarios podrían relacionarse con la estimulación hormonal para la secreción de factores de crecimiento propios de la bacteria al medio circundante, los cuales pueden servir como señal a otras células para comenzar y estimular su división celular. Los pulsos de señales han sido

descritos en hongos como el *Dictyostelium discoideum* (Konijn y cols., 1967; Barkley, 1969; Wang M., 1988). Este microorganismo tiene receptores extracelulares para AMPc, y en condiciones adversas expulsa al medio, a través de mecanismo de pulsos, grandes cantidades de este metabolito como señal para otras células. Esto conduce al control del ciclo celular, la aglomeración y formación de micelio como mecanismo defensivo. En este sentido, también se han descrito en diversas bacterias y hongos procesos de señalización intercelular, a través de moléculas señal propias llamadas autoinductores, existiendo diversos mecanismos. Estos procesos incluyen la producción, síntesis y subsiguiente detección de las moléculas señal que le permite a una población de microorganismos regular la expresión genética colectiva y, por lo tanto, controlar la conducta del cultivo entero ante cualquier estímulo en el medio. Ahmer, 2004; Henke y Bassler, 2004). Sin embargo, no ha sido reportado un sistema específico de comunicación para la bacteria *E. coli*, (Henke y Bassler, 2004). El único hallazgo que relaciona la hormona insulina con la bacteria *E. coli* es el de una proteasa que presenta homología estructural con la Enzima Degradante de Insulina humana (EDI) abundante en el espacio periplásmico (Swamy y Goldberg, 1982; Affholter y cols., 1988; Fricke y Aurich, 1989). La existencia de esta enzima en *E. coli* permite inferir la posibilidad de que alguno de sus sustratos presente a su vez homología con la insulina. Su localización periplásmica sería conveniente para procesar péptidos, posibles moléculas señalizadoras, del medio ambiente.

Otro aspecto importante a considerar sería el modo de acción intracelular de las insulinas en *E. coli* usando el medio de cultivo LB. Este medio contiene bacto-triptona y extracto de levadura. Por lo tanto, la disponibilidad de biomoléculas en este medio se reduce a péptidos, aminoácidos, nucleótidos y bases nitrogenadas principalmente. La cantidad de carbohidratos simples como la glucosa es de trazas o están ausentes por completo. Cuando la bacteria es cultivada en este medio, las principales biomoléculas para ser usadas en los procesos catabólicos y generar energía intracelular deben ser los aminoácidos del medio, y esto eleva la concentración de AMPc, que a su vez provoca que los procesos catabólicos no se inhiban. De los componentes principales del medio LB, los aminoácidos son la mejor fuente de energía disponible, ya que degradar bases nitrogenadas para tal efecto, sería muy ineficiente por el trabajo químico que hay que efectuar en su

degradación. Por lo tanto, el uso de los esqueletos carbonados de los aminoácidos sería la alternativa más viable. Al agregar insulina al medio, esta podría activar, por ejemplo, el transporte de aminoácidos en la membrana celular y ello explicaría la estimulación de la división celular por las hormonas. De acuerdo a esta idea, las insulinas podrían estar activando los operones de los transportadores de aminoácidos. En mamíferos es bien conocido que la insulina activa la incorporación de aminoácidos al interior celular para entrar en los procesos de producción energética (Kim y cols., 2013).

A parte de la incorporación de aminoácidos, una de las acciones más importantes de la insulina es facilitar la entrada de glucosa a la célula e intervenir en los procesos metabólicos que permiten su almacenamiento y su uso como fuente de energía (Kim y Novak, 2007; Choi y Kim, 2010; Low y cols., 2013). Cuando se agregó glucosa en cantidades variables al medio de cultivo LB, el carbohidrato no estimuló el crecimiento de *E. coli* bajo las condiciones ensayadas (Figura 3), en su lugar, se observó inhibición respecto al control (medio LB), y esta inhibición dejó de tener efecto a medida que el cultivo entró en la fase logarítmica de crecimiento, aunque nunca la proliferación celular en presencia de glucosa llegó a superar al control. Es bien conocido que la glucosa es mejor fuente energética que los aminoácidos. Sin embargo, hay que considerar las condiciones en que se llevaron a cabo los experimentos. Los cultivos se iniciaron usando un pre-inóculo crecido en medio LB. Por lo tanto, las bacterias debían tener activas todas las vías metabólicas para utilizar los insumos que este medio les ofrece: aminoácidos y bases nitrogenadas principalmente. Lo más probable es que al añadir glucosa al medio LB debió ocurrir una represión catabólica y disminución de los niveles de AMPc, provocando que muchos operones inducibles para procesar los insumos del medio LB dejaran de ser transcritos, un mecanismo que ya se ha descrito en *E. coli* (Stulke y Hillen, 1999; Kotte y cols., 2014). Este efecto puede explicar la inhibición inicial del crecimiento en presencia del carbohidrato. Al mismo tiempo debieron activarse las vías para metabolizar a la glucosa, y esto correspondería con la recuperación y estimulación del crecimiento para alcanzar finalmente al control en medio LB. A nivel molecular, esta adaptación requiere una importante reorganización del flujo metabólico central del carbono, con la represión de genes gluconeogénicos y la inducción de genes glicolíticos, como ya se ha reportado en *E.*

coli (Kao y cols., 2005), especialmente los que participan en las reacciones de la gluconeogénesis (*pckA*, *maeb*, *sfcA*), y la ruta de Embden-Meyerhoff (Keseler y cols., 2009).

El resultado obtenido en este trabajo, en relación al efecto inhibitorio momentáneo sobre el crecimiento celular al añadir glucosa al medio LB no es extraño, pues desde los primeros estudios de la fisiología bacteriana, la inoculación de una población bacteriana en un nuevo medio ha sido conocida por resultar en un período donde no hay proliferación aparente antes del crecimiento en la nueva fuente de nutrientes (Monod, 1949). Esta fase latente se atribuye clásicamente a la duración del requisito de la adaptación bioquímica en las células individuales, que se cree cambian homogéneamente en respuesta al nuevo sustrato. Sin embargo, las últimas investigaciones plantean que el tiempo de retraso aparente con el cambio de nutrientes es causado por el crecimiento exclusivo inicial de una pequeña subpoblación fenotípica que se adapta rápidamente al cambio y el resto entra en un estado latente hasta que las condiciones vuelvan a ser las originales (Kotte y cols., 2014).

Al adicionar diferentes cantidades de glucosa e insulina Humulin al medio LB (Figura 3A→C), no se detectó la respuesta inhibitoria característica sobre el crecimiento que ocasionó la presencia de glucosa solamente, en su lugar, se detectó una estimulación que alcanzó valores máximos semejantes a los cultivos en presencia de la insulina sin el carbohidrato (Figuras 3 y 4A). Esto indica que la insulina de secuencia regular más glucosa está provocando una respuesta celular diferente a la obtenida solo en presencia del carbohidrato. Al examinar las gráficas del porcentaje de estimulación del crecimiento respecto al control (medio LB), se observa que con Humulin en presencia de la menor concentración de glucosa (1 mM) (Figura 3A), los porcentajes fueron inferiores al control en la etapa prelogarítmica del crecimiento y con un comportamiento semejante a cuando solo se encontraba glucosa en el medio, por lo tanto, se deduce que frente a dos señales contradictorias, por una parte la insulina activando operones del metabolismo de aminoácidos, y por la otra la glucosa activando genes del metabolismo glucolítico, ocurre la represión catabólica al inicio del cultivo disminuyendo la señal de la insulina. Pero, al entrar el cultivo en la fase logarítmica de crecimiento se observó un pulso estimulatorio

sobre el control semejante al detectado en la presencia solo de Humulin y la estimulación se mantuvo hasta el final con menor intensidad. Dicha estimulación no puede ser atribuida a la señal de la glucosa de manera independiente, es decir, que las señales contradictorias al principio se hayan resuelto a favor de la acción del carbohidrato y hayan dejado sin efecto la acción de la insulina en el medio LB, puesto que la glucosa por sí misma y sin insulina no causo estimulación del crecimiento sobre el control. Con esta consideración, se podrían argumentar dos explicaciones posibles: la primera es que las señales contradictorias se hayan resuelto a favor de la insulina en el metabolismo de aminoácidos para los requerimientos energéticos y haya quedado sin efecto el uso de la glucosa, y la segunda, que las señales contradictorias se haya resuelto a favor de la glucosa, pero en este caso, es evidente que debió ser con la intervención de la insulina, posiblemente facilitando la activación de operones glucolíticos y favoreciendo la incorporación de glucosa a la célula bacteriana, de esta manera la señal del carbohidrato no sería independiente. La segunda opción parece la más probable, puesto que al aumentar la concentración de glucosa a 2 y 5 mM (Figuras 3B y C), no se detectó represión catabólica al principio del crecimiento bacteriano, sino una respuesta rápida de estímulo de la proliferación celular con un aumento de la velocidad entre 45 y 70 % respecto al estímulo inicial que ejerció solo la presencia de Humulin en el medio (Figura 4B), es decir, que esa respuesta no puede ser atribuida a la insulina de manera independiente, ni tampoco a la glucosa, puesto que de forma individual en el cultivo ambos aditivos no estimularon el crecimiento respecto al control en ese momento del crecimiento celular.

De lo anterior se deduce, que el aumento de la concentración de glucosa en el medio facilitaría la acción de la insulina Humulin hacia las vías glucolíticas y el paso de un crecimiento gluconeogénico a un crecimiento glucolítico. Esto recuerda el mecanismo en mamíferos, donde la concentración extracelular de glucosa es un parámetro crucial para la acción intracelular de la insulina (Kim y cols., 2013). Esta consideración también es reforzada por resultados similares reportados en *E. coli*, donde en una situación de cambio de nutrientes de una vía glucolítica a gluconeogénica, la concentración del nuevo nutriente influye en su incorporación al interior celular y en la probabilidad de que las células reanuden el crecimiento en esa nueva vía (Kotte y cols., 2014). Sin embargo, se necesitan

más estudios para demostrar todos estos planteamientos deducidos de la observación de las curvas de crecimiento.

Para tratar de establecer los posibles mecanismos moleculares que la hormona puede estar promoviendo en *E. coli*, se exploró sobre los conocimientos existentes en las rutas metabólicas de la bacteria. Las células pueden inferir la concentración extracelular de sustratos a través de un flujo metabólico intracelular que regula la expresión de genes (Kochanowski y cols., 2013). Uno de estos sensores de flujo es el factor transcripcional Cra, que controla la transcripción de una variedad de genes de la ruta gluconeogénica, la vía Embden-Meyerhoff, el ciclo del ácido cítrico y la respiración aeróbica (Shimada y cols., 2011). La actividad de Cra es esencial para el crecimiento en condiciones gluconeogénicas y esa actividad es inhibida por el metabolito fructuosa 1,6-bisfosfato (FBP), considerado como un señalador del flujo metabólico. A su vez, la cantidad de FBP es controlada por la enzima fructuosa-1-6-bisfosfatasa (Fbp), puesto que es su sustrato, y esta enzima es activada por fosfoenolpiruvato (PEP). Por lo tanto, el sistema Cra-FBP es considerado un sensor de flujo y un regulador clave en el cambio glucólisis/gluconeogenesis (Kotte y cols., 2014).

La insulina Humulin debería actuar sobre el sistema Cra-FBP descrito de forma directa o indirecta. En el medio LB, la hormona podría promover la incorporación de aminoácidos que entran en los procesos gluconeogénicos, de esta forma aumentaría la concentración intracelular de PEP y se activaría Fbp, con la consiguiente disminución de FBP y activación de Cra, aumentando de esta forma la sobreexpresión de las enzimas que intervienen en las rutas gluconeogénicas, obteniéndose por esta vía la energía necesaria para la división celular. En presencia de glucosa, la hormona Humulin facilitaría su incorporación al interior celular, activándose la ruta glucolítica, de esta forma aumentarían los niveles de FBP que inhiben a Cra, por consiguiente, se inhibe la ruta gluconeogénica. Los niveles de PEP tampoco serían elevados como para activar a Cra, puesto que aumentaría la actividad de la piruvato quinasa cuyo sustrato es PEP. En un trabajo realizado en la levadura *S. cerevisiae* se demostró que la insulina humana de secuencia regular estimulaba la actividad de la enzima piruvato quinasa dependiente de la concentración

hormonal (Triana y cols., 2011), por lo tanto, también podría operar un mecanismo similar en *E. coli*.

Los resultados del crecimiento celular con Humalog en presencia de glucosa fueron diferentes a los obtenidos con Humulin (Figura 3D→F). La glucosa añadida al medio LB inhibió la estimulación de la insulina modificada sobre la proliferación. Por lo tanto, el carbohidrato podría estar provocando la represión catabólica y este efecto tendió a disminuir a medida que aumentaba la concentración del carbohidrato (Figuras 3D→F y Figura 4), es decir, se produjo un efecto similar al detectado con Humulin y 1 mM glucosa, pero sin observarse la estimulación sobre el control después de ocurrir la posible represión catabólica (comparar Figura 3A con Figura 3D→F). Sin embargo, se encontró que la mayor concentración de glucosa (5 mM) en presencia de Humalog produjo en la fase logarítmica media y tardía del crecimiento una estimulación significativa respecto a los cultivos en presencia solo de la hormona o de la glucosa (Figura 3F). Esto indica al menos, que en esta fase del crecimiento y después de una probable represión catabólica, la insulina modificada y la glucosa no están actuando de manera independiente, y las explicaciones anteriores para Humulin sobre la activación de la ruta glucolítica e inhibición de la ruta gluconeogénica, también son válidas para Humalog.

Los resultados mostraron que Humalog tuvo una acción más rápida respecto a Humulin sobre el crecimiento en el medio LB y también causó una mayor velocidad inicial de proliferación en el cultivo, y quizás en estas características radique la diferencia entre ambas insulinas al añadir glucosa al medio. Es posible que la señal de Humalog en la ruta gluconeogénica sea más intensa que con Humulin y no se cumple el umbral necesario para cambiar a la vía glucolítica al añadir el carbohidrato, este umbral debería superarse al aumentar la concentración de glucosa y agotarse los nutrientes gluconeogénicos, principalmente en la etapa tardía del crecimiento, y esto fue lo que se observó. Este planteamiento se hace con base a los resultados obtenidos en un trabajo sobre el efecto del cambio de nutrientes glucolíticos a gluconeogénicos en el crecimiento de *E. coli* (Kotte y cols., 2014). Sólo las células que se abstendrían de un crecimiento muy rápido en glucosa mantenían su capacidad para cambiar al crecimiento gluconeogénico cuando ocurría el

agotamiento de la glucosa; las células con una tasa de crecimiento glicolítico muy rápido no podían generar un flujo alto y suficiente en la vía gluconeogénica inicial a través de la ruta Embden-Meyerhoff y entraban en estado latente. Esta observación indicaba una compensación inherente entre la tasa de crecimiento glicolítica y la capacidad para adaptarse al crecimiento en gluconeogénesis. Es evidente que si este es el caso en este trabajo, pero en sentido inverso, la adaptación con Humulin fue más eficiente que con Humalog. Sin embargo, también se infiere que Humalog debe tener mayor capacidad o potencia de activación de las vías de señalización bajo una condición nutricional dada, que en este caso sería inicialmente la gluconeogénica, y por consecuencia la obtención de energía suficiente para una mayor capacidad mitogénica. Sin considerar las diferencias detectadas entre ambas hormonas, los resultados demostraron que las dos insulinas tienen la capacidad de activar la división celular de *E. coli* y pueden estimular el crecimiento bacteriano en diferentes condiciones nutricionales.

Además del interés puramente bioquímico sobre los mecanismos de acción hormonal, los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren la posibilidad de que microorganismos responsables de enfermedades infecciosas en pacientes con Diabetes mellitus sean estimulados a crecer por la insulina. El estadio de la patología donde se presenta hiperinsulinemia (primera etapa de la Diabetes tipo 2 cuando ocurre la resistencia a la hormona), puede estar asociado a infecciones resistentes y crecimiento bacteriano acelerado. Por otro lado, una vez establecida la patología diabética muchos de los tratamientos aplicados pueden incluir diversos tipos de insulinas, con difícil regulación en cada paciente, por lo que pueden sufrir frecuentes cuadros de hiperinsulinemia. Si este es el caso, los resultados de este estudio indican que es necesario entender mejor los mecanismos por los cuales las diferentes hormonas usadas en los tratamientos afectan a las células bacterianas para desarrollar mejores tratamientos antibacterianos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adnan E. (2007). Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. *BioEssays*. 29: 811–818.
- Affholter, J.A., Fried, V.A. y Roth, R.A. (1988). Human insulin degrading enzyme shares structural and functional homologies with *Escherichia coli* protease III. *Science*. 242(4884): 1415-1418.
- Ahmad K. (2014). Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus. . Review. *J Tradit Chin Med*. 34(2): 234-7.
- Ahmer, B. (2004). Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular Biology*, 52(4): 933-945.
- American Diabetes Association (ADA). (2009). Standards of medical care in diabetes-2009. *Diabetes Care*. 32 Suppl 1: S13-61.
- Anzola X. y Bello A. Tutores: Azuaje N., Ferreras A. C. y Triana-Alonso F. (†) (2011). Determinación de productos de excreción y de sus posibles variaciones por efecto de la insulina durante el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*. Tesis de grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo, Venezuela.
- Baker E.N., Blundell T.L., Cutfield J.F., Cutfield S.M., Dodson E.J. y Dodson G.G. (1988). The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5Å Resolution Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. 319: 369–456.
- Barkley, D. S. (1969). Adenosine-3',5'-phosphate: Identification as acrasin in a species of cellular slime mould. *Science, New York*, 165(3898): 1133-1154.
- Berdicevsky I. y Mirsky N. (1994). Effects of insulin and glucose tolerance factor (GTF) on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycose*. 37: 405-410.
- Bi Y., Wang T., Xu M., Xu Y., Li M., Lu J., Zhu X. y Ning G. (2012). Advanced research on risk factors of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res*. 28 (2): 32-9.
- Bonvecchio A., Becerril V., Carriedo A. y Landaeta M. (2011). Sistema de salud de Venezuela. *Salud Pública de México*. 53 (2): S275-286.
- Brange J. y Vølund A. (1999). Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles. *Adv Drug Deliv Rev*. 35: 307–335.
- Brunetti A., Chiefari E. y Foti D. (2014). Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus. Review. *World J Diabetes*. 5(2):128-140.

- Burge M. R. y J. Carey J. D. (2004). Vitiligo Associated With Subcutaneous Insulin Lispro Infusion in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 27: 275-276.
- Camargo H. y Bastidas A. Tutora: Triana J. (2002). Efecto de la insulina en el crecimiento celular y en un sistema *in vitro* de la levadura *S. cerevisiae*. Tesis de Grado, Escuela de Bioanálisis, Sede Aragua, Universidad de Carabobo. República Bolivariana de Venezuela.
- Choi K. y Kim Y. (2010). Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 Diabetes. *Korean Journal of Internal Medicine*. 25(2): 119–129.
- Clausen R., Jørgensen T. G., Jørgensen K. H., Johnsen A. H., Led J. J. y Josefsen K. (2002). The (ProB27, ThrB28) human insulin analogue is more potent and more rapidly absorbed from subcutis than human insulin. *Eur J Endo*. 147: 227–233.
- Fajans S. S. y Bell G. I. (2011). MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care*. 34 (8): 1878-84.
- Fauci A., Braunwald E., Kasper D., Hauser S., Longo D., Jameson J. y Loscalzo J. (2008). *Harrison Principios de Medicina Interna*. (17ª ed.). Mexico: McGraw-Hill Interamericana.
- Fernandez V., Clavell E., Villasmil J. y Cols. (2006). Niveles Basales De Insulina En Una Población Del Estado Zulia, Venezuela. *Investigación Clínica*. 47(2): 167-177.
- Ferreira de Souza A. y Lopez J. (2004). Insulin or Insulin-like studies on unicellular organism: a review. *Braz Arch Biol Tech*. 6(47): 973-981.
- Figuera M. y García L. Tutora: Triana J. (2007). Efecto de las hormonas insulina y glucagon en el crecimiento celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Grado, Licenciatura en Bioanálisis, Universidad de Carabobo, Maracay, Republica Bolivariana de Venezuela.
- Fineberg E., Huang J., Brunelle R., Gulliya K. S. y Anderson Jr, J. H. (2003). Effect of Long-Term Exposure to Insulin Lispro on the Induction of Antibody Response in Patients With Type 1 or Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 26:89-96.
- Fricke, B. y Aurich, H. (1989). Characterization of a periplasmic insulin-cleaving metalloproteinase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biomedical Biochimica Acta*. 48(9): 661-671.
- Gámez A. y González B. Tutora: Triana J. (2008). Efecto de la insulina y ketoconazol sobre la actividad del citocromo P450 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo, Venezuela.

- González F., González R. y Triana-Alonso F.(†). (2011). Influencia de las hormonas tiroxina, insulina, glucagón y cortisol en el crecimiento y expresión genética de *Escherichia coli* en medio de cultivo líquido. Avances en Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Venezuela.
- Griffin M. E., Feder A. y Tamborlane W. V. (2001). Lipoatrophy Associated With Lispro Insulin in Insulin Pump Therapy An old complication, a new cause? Diabetes Care. 24: 174-176.
- Guaderrama A. y Cabrera L. Tutora: Triana J. (2005) Efecto de la insulina en la expresión genética de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo, Venezuela.
- Hansen B.F., Danielsen G.M, Drejer K., Sørensen A.R., Wiberg F.C., Klein H.H. y Lundemose A.G. (1996). Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. Biochem J. 315: 271–279.
- Hansen B.F., Danielsen G.M., Drejer K., Sørensen A.R., Wiberg F.C., Klein H.H., Lundemose A.G. (1996). Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. Biochem J. 315 (1): 271-279.
- Haskur S. y Makal M. Tutores: Triana-Alonso F.(†). (2011). Efecto de la insulina sobre patrones de resistencia de bacterias aisladas de pie diabético. Licenciatura en Bioanálisis. Tesis de grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo, Venezuela.
- Hemer S., Konrad C., Spiliotis M., Koziol U., Schaack D., Förster S., Gelmedin V., Stadelmann B., Dandekar T., Hemphill A., Brehm K. (2014). Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. BMC Biol. 12: 5-10.
- Henke, J. y Bassler, B. (2004). Bacterial social engagements. Trends in cell Biology, 11(14): 648-656.
- Hernández V., Infante F., Rojas R., Ferreras A., Ramírez N., Tovar E. y Triana F. (2008). La Insulina Humana Estimula el Crecimiento y afecta el Perfil de Proteínas Celulares de la Bacteria *Escherichia Coli*. Memorias del VI Congreso de Investigación de la Universidad de Carabobo.
- Ipriani E. y Quintanilla A. (2010). Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina. Rev Med Hered. Lima. 21(3).

- Kao K.C., Tran L.M., Liao J.C. (2005). A global regulatory role of gluconeogenic genes in *Escherichia coli* revealed by transcriptome network analysis. *J Biol Chem* 280: 36079 – 36087.
- Keseler I.M., Bonavides-Martinez C., Collado-Vides J, Gama-Castro S., Gunsalus R.P., Johnson D.A., Krummenacker M., Nolan L.M., Paley S., Paulsen I.T., Peralta-Gil M., Santos-Zavaleta A., Shearer A.G., Karp P.D. (2009) EcoCyc: a comprehensive view of *Escherichia coli* Biology. *Nucleic Acids Res* 37: D464 – D470.
- Kim S.K., y Novak R.F. (2007) The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol Ther.* 113(1): 88–120.
- Kochanowski K, Volkmer B, Gerosa L, Haverkorn van Rijsewijk B, Schmidt A, Heinemann M (2013) Functioning of a metabolic flux sensor in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1130 – 1135.
- Konijin, T.M.; Van de Meene, J. G. C.; Bonner, J. T. y Barkley, D. S. (1967). The acrasin activity of adenosine-3', 5'- cyclic phosphate. *Proceedings National Academy Sciences*, 58: 1152-1154.
- Kotte O., Volkmer B., Radzikowski J.L. y Heinemann M. (2014). Phenotypic bistability in *Escherichia coli*'s central carbon metabolism. *Molecular Systems Biology*. 10: 736 2014.
- Kristensen C., Kjeldsen T., Wiberg F.C., Schäffer L., Hach M., Havelund S., Bass J. y Steiner D.F. (1997). Andersen AS: Alanine scanning mutagenesis of insulin. *J Biol Chem*. 272: 12978–12983.
- Le Roith D., Shiloach J., Roth J. y Lesniak M. (1981). Insulin or a closely related molecule is native to *Escherichia coli*. *J. Biol. chem.* 256: 6533 – 6536.
- Liang C.P., Han S., Okamoto H., Carnemolla R., Tabas I., Accili D. y Tall A.R. (2005). Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages. *J Clin Invest*. 113: 764 –773.
- Licea M. Análogos de insulina. (2006). *Rev Cubana Endocrinol* [revista en la Internet]. Dic [citado 2014 Jun 09]. 17(3): Disponib en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sciarttex&t&pid=S1561-29532006000300005&lng=es>.
- Low J., Mitchell J., Morgan G., Parton R., Rawlings A., Jacinda Bax., Do O., Gaisano H., Zavortink P., y Peter Thorn. (2013). Glucose principally regulates insulin secretion in mouse islets by controlling the numbers of granule fusion events per cell. *Diabetologia*. 56(12): 2629-37.
- Lowe W.R. (1998). Diabetes Mellitus. *En: Principles of Molecular Medicine*, Jameson J. Larry ed., Northwestern University Medical School, Chicago, IL. Pp 433-442.

- Lüddecke H. (2007). Predictive a global, prospective observational study to evaluate insulin detemir treatment in types 1 and 2 diabetes: baseline characteristics and predictors of hypoglycaemia from the European cohort. *Diabetes Obes Metab.* 9: 428-34.
- Maassen J. A., Leen M., Einar van Essen H., Heine R. J., Nijpels G., Roshan S. Tafrechi J., Raap A. K., Janssen, G. M. C. y Lemkes, H. H. P.J. (2004). Mitochondrial Diabetes. Molecular Mechanisms and Clinical Presentation. *Diabetes.* 53 (1): 103-109.
- Martínez A., Tutores: Fraile G. y Triana J. (2011). Efectos de la insulina humana y sus análogos sobre la proliferación, apoptosis y necrosis en células U937. Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Morfológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela.
- Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS). (2011). Anuario de Mortalidad 2009. República Bolivariana de Venezuela.
- Monod J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol.* 3: 371 – 394.
- Morimoto S. (2000). Mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de la síntesis de insulina por glucosa. *Revista del Hospital General “Dr. Manuel Gea Gonzalez.* 12(3): 118-120.
- Müller G, Rouveyre N, Upshon C, Grobete E, Bandlow W. Insulin signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Interaction of human insulin with a putative binding protein. *Biochemistry.* 1998c; 37:8696-8704.
- Müller G., Grey S., Jung C. y Bandlow W. (2000). Insulin-like signaling in yeast: modulation of protein phosphatase 2A, protein kinase A, cAMP- specific phosphodiesterase, and glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities. *Biochemistry,* 39:1475-1488.
- Müller G., Rouveyre N., Crecelius N. y Bandlow W. (1998). Insulin Signaling in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Stimulation of Glucose Metabolism and Snf1 Kinase by Human Insulin. *Biochemistry.* 37 (24) : 8683 -8695.
- Nathan D.M., Buse J.B.y Davidson M.B. (2009). Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetes Care.* 32: 193-203.
- Olivares J. y Arellano A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la Insulina. *Revista de Educación Bioquímica.* 27(1): 9-18.
- Olokoba A. B., Obateru O. A. y Olokoba L. B. (2012). Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med J.* 27 (4): 269-73.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (Octubre de 2013). Informe sobre la Diabetes. Nota descriptiva N°312. En:[http:// www.who.int/mediacentre/ factsheets/ fs312/es/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/). Acceso: 08 de Junio de 2014.
- Ortiz S., Rico L., Moron F., Sole M. y Valencia, A. (2005). GNOM. 4th European Conference on Computational Biology. Madrid, España.
- Pedro-Botet J. y Núñez-Cortés J.M. (2014). The importance of vascular risk in type 2 diabetes mellitus]. Clin Investig Arterioscler. 26(3): 138-9.
- Plotkin B. y Viselli S. (2000). Effect of Insulin on Microbial Growth. Current Microbiology. 41(1):60-4.
- Rakatzi I., Ramrath S., Ledwig D., Dransfeld O., Bartels T., Seipke G. y Eckel J. (2003). A Novel Insulin Analog With Unique Properties LysB3, GluB29 Insulin Induces Prominent Activation of Insulin Receptor Substrate 2, but Marginal Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1. Diabetes. 52: 2227-2238.
- Reggio R., Camargo H., Bastidas A., Ferreras A., Bandeira E., Triana F. y Triana, J. (2002). Efecto de la insulina en el crecimiento celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Anales de Investigación. Memorias del IV Congreso de Investigación y I Congreso de Postgrado de la Universidad de Carabobo, Tomo I, T:427. ISBN: 980-233-332-8. Editora CDCH-UC.
- Rivera R., Santiago C., Mitelman G., Bahamondes F. y Larraín A. (2003). Hiperinsulinismo Fisiopatología y Manifestaciones Clínicas en Obstetricia y Ginecología. Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología. 68(1): 58-64.
- Rodriguez G. (2003). Insulinoterapia. Revista Medica Herediana. 14(3): 141- 144.
- Sáez J., Granja V., Valero M., Ferrari J., Herreros A. y López C. (2008). Insulinoterapia en el medio hospitalario. Nutr Hosp. 23(2): 126-133.
- Sánchez-Reyes L., Fanghänel G., Márquez-Cid M. E., Salazar Rocha R., Labastida-Sánchez C., Solís-Pérez A. y Tusie Luna M.T. (2001). Actualización en los diferentes subtipos de diabetes tipo “MODY”. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 9(1): 5-11.
- Sang Gyun Kim S. G., Buel G. R., y Blenis J. (2013). Nutrient Regulation of the mTOR Complex 1.
- Santiago E., Whittam T., Winkworth C., Riley M. y Lenski R. (2005). Genomic divergence of *Escherichia coli* strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates. Microbiological Review, 8(4): 271-278.
- Sarco-Lira C.F. Tutores: Triana-Alonso F. (†) y Triana J. (2012). Efecto de la insulina humana en el crecimiento y perfil proteico de *Klebsiella pneumoniae*. Tesis de

Grado para optar al título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencia y Tecnología, Departamento de Biología, Universidad de Carabobo.

- Schaechter, M. (2001). *Escherichia coli* and *Salmonella*: The View From Here. Microbiological Molecular Biology Review, 65(1): 119–130.
- Schumann W. y Ferreira L. (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Genetic Molecular Biology, 27: 3.
- Shimada T., Yamamoto K., Ishihama A. (2011). Novel members of the Cra regulon involved in carbon metabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol 193: 649 – 659. Signaling Pathway. Mol. Cells. 35: 463-473.
- Slieke L.J., Brooke G.S., Dimarchi R.D., Flora D.B., Green L.K., Hoffmann J.A., Long H.B., Fan L., Shields J.E., Sundell K.L., Surface P.L. y Chance R.E. (1997). Modifications in the B10 and B26–30 regions of the B chain of human insulin alter affinity for the human IGF-I receptor more than for the insulin receptor. Diabetologia. 40: S54–S61.
- Souza A. y López J. (2004). Insulin or insulin-like studies on unicellular organisms: a review. Brazilian Archives of Biology and Technology. 47(6): 973-981.
- Stulke J, Hillen W (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. Curr Opin Microbiol 2: 195 –201.
- Swamy, K.H. y Goldberg, A.L. (1982). Subcellular distribution of various proteases in *Escherichia coli*. Journal Bacteriology. 149: 1027-1033.
- Triana J., Triana-Alonso F. (†), González G., Lozano G., Reggio R., Ferreras A.C., Bandeira E. y Pérez-Ybarra L.M. (2011). Efecto de la insulina en *Saccharomyces cerevisiae*: estimulación de la actividad enzimática de piruvato quinasa, expresión de proteínas citoplasmáticas y proliferación celular. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 31(1): 48-56.
- Triana P, De Freitas A. y Gómez K. Tutores: Triana-Alonso F. y Triana J. (2008). Estudio de las Bacterias que afectan al Pié Diabético: Crecimiento *in vitro*, efecto de la Insulina y susceptibilidad a antibióticos. Trabajo Especial de Grado para optar al título de Médico Cirujano, Escuela de Medicina "Dr. Witremundo Torrealba", Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Venezuela.
- Tuntunji M. y Vera J. Tutora: Triana J. (2005). Efecto del ketoconazol en el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de insulina. Tesis de Grado, Licenciatura en Bioanálisis, Universidad de Carabobo, Maracay, Republica Bolivariana de Venezuela.

- Vehik K., Hamman R.F., Lezotte D., Norris J.M., Klingensmith G.J., Rewers M. y Dabelea D. (2008). Trends in High-Risk HLA Susceptibility Genes Among Colorado Youth with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 31(7):1392-6.
- Velloso L., Eizirik D. y Cnop M. (2013). Type 2 diabetes mellitus-an autoimmune disease? Nature reviews. *Endocrinology*. 9(12): 750-5.
- Wang M, Van Haastert, P.J., Devreotes, P.N. y Schaap, P. (1988). Localization of chemoattractant receptors on *Dictyostelium discoideum* cells during aggregation and down-regulation. *Developmental Biology*. 128(1): 72-7.
- Xu C.X., Zhu H.H. y Zhu Y.M. (2014). Diabetes and cancer: Associations, mechanisms, and implications for medical practice. Review. *World J Diabetes*. 5(3):372-380.