

INFLUENCIA DE LAS HORMONAS TIROXINA, INSULINA, GLUCAGÓN Y CORTISOL EN EL CRECIMIENTO Y EXPRESIÓN GENÉTICA DE *Escherichia coli* EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO

González, Francis, González, Rosneyvic, Francisco Triana- Alonso (†)

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UC), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Venezuela

RESUMEN

La bacteria *Escherichia coli* es sensible a la acción de la insulina. Debido a la susceptibilidad a las infecciones en pacientes con desórdenes hormonales tales como la Diabetes Mellitus, es interesante conocer cómo otras hormonas pueden afectar el crecimiento y metabolismo bacteriano. Por este motivo se estudió la influencia de las hormonas insulina, glucagon, cortisol y tiroxina en el crecimiento, expresión de polipéptidos celulares y perfil de los ARN ribosomales de *E. coli* crecida en medio líquido Luria-Bertani. Para ello, las bacterias se cultivaron en presencia individual de cada una hormonas y el crecimiento se midió espectrofotométricamente a diferentes tiempos. Las células fueron recolectadas y lisadas para extraer las proteínas celulares, las cuales se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS y densitometría cuantitativa. La insulina (0,14 U/mL) estimuló el crecimiento de la bacteria en un 60%, mientras que el cortisol (37 nM) lo hizo en un 30%. El glucagon (0,56 nM) inhibió en 25% el crecimiento, mientras que la tiroxina no lo afectó significativamente. La insulina y el cortisol produjeron variaciones en la expresión de un mayor número de polipeptidos en relación al glucagon y la tirosina. El perfil de los ARN ribosomales de los extractos celulares, no mostró cambios significativos por efecto de estas hormonas. Los resultados indican que las hormonas estudiadas afectan en diferente medida el crecimiento y expresión genética de *E. coli*, y son útiles para estudios acerca de cómo el tratamiento con hormonas pueda afectar directamente la proliferación bacteriana en casos de enfermedades con alteraciones hormonales, como la diabetes mellitus.

Palabras clave: *E. coli*, Hormonas, Crecimiento bacteriano, Expresión genética.

INTRODUCCION

La bacteria *Escherichia coli* es un bacilo Gramnegativo que pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae; son microorganismos ubicuos que se encuentran de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación (1). Esta bacteria es de fácil cultivo en el laboratorio y crece eficientemente en los medios de uso común (2). Por otra parte, la *E. coli* se ha aislado con mayor frecuencia como agente causal de infecciones de las vías urinarias, heridas, neumonía, meningitis y de septicemias (3).

La bacteria *E. coli* posee unos factores de virulencia especializados que se clasifican en dos categorías generales: las adhesinas y las exotoxinas (4). La importancia relativa de cada uno de estos factores depende no solo de la genética de una cepa en

particular de microorganismos, sino también del sitio de infección y de la afección subyacente del huésped (1). Actualmente se acepta que en el proceso de crecimiento bacteriano, existen señales químicas generadas por las bacterias llamadas autoinductores (5), que permiten a las bacterias coordinar actividades amistosas (simbiosis) o adversas (patogénicas) con su hospedero y además, participan en la determinación de densidad poblacional, activación o represión de genes específicos, formación de biofilm bacterianos, etc. (6).

En una infección el microorganismo que la causa está expuesto a una variedad de factores del huésped, incluyendo las hormonas, entre ellas la insulina que estimula el crecimiento de *E. coli* (7). Uno de los principales efectos de la insulina es la modulación de la expresión genética a nivel transcripcional y en la síntesis de proteínas (8), el almacenamiento de glucosa, la captación de aminoácidos, la síntesis de lípidos y la inhibición de la lipólisis y la gluconeogénesis (4). En microorganismos unicelulares como bacterias y protozoarios, se ha demostrado la producción de sustancias homólogas a la insulina y la existencia de receptores en la membrana celular a los que la insulina puede unirse e iniciar una señal dependiente de proteína kinasas, que se relaciona con la actividad metabólica del microorganismo (9).

La capacidad de respuesta de las bacterias Gram positivas y Gram negativas a la insulina está afectada por las concentraciones adicionadas de la hormona a los medios de cultivo, observándose que el crecimiento bacteriano se incrementa cuando se añaden glucosa e insulina en bajas concentraciones al medio (10). Por otra parte, los cultivos de una cepa recombinante de *E. coli* en medio líquido Luria Bertani (LB) en presencia de la hormona insulina, muestran una tendencia significativa a crecer con mayor eficiencia que los cultivos control sin la hormona. Adicionalmente, la presencia de la hormona determinó una mayor expresión de polipéptidos de tamaño compatible con las adhesinas (11). Estos resultados fueron similares con otras bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium* spp, donde además se ha demostrado que la presencia de insulina promueve resistencia al efecto de antibióticos que son efectivos en ausencia de la hormona (12). Considerando los resultados obtenidos del efecto estimulante de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos bacterianos (11, 12) se debe considerar que una concentración de insulina más alta de lo normal pueda ser un factor promotor adicional para las infecciones. Resulta muy interesante observar que los efectos previamente señalados sobre el crecimiento

bacteriano, tienen paralelismo con las acciones de la insulina en el hombre y otros mamíferos: se comporta como un factor que impulsa el anabolismo y la división celular. Si existe este paralelismo entre el efecto de la insulina en el humano y en las bacterias sería interesante también estudiar el efecto de otras hormonas como el glucagon y el cortisol (antagonistas de varios de los efectos metabólicos de la insulina), así como de la tiroxina, sobre el crecimiento bacteriano.

Trabajos previos señalan que el glucagon es capaz de inhibir el crecimiento celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones aeróbicas y en medio rico (13), mostrando una actividad antagónica a la insulina que previamente se demostró como estimulante del crecimiento de este hongo (14).

Aunque no existen estudios relacionados con el efecto del cortisol en el crecimiento bacteriano, se determinó que los corticosteroides usados en la terapéutica de la sepsis, no producen un efecto favorable en la morbilidad y mortalidad, e incluso, se propuso un incremento del riesgo de súper infección predisponente a la muerte, debido a la inmunosupresión causada por la administración de estos medicamentos (15). Es posible que además, los corticosteroides, promuevan también el crecimiento de bacterias.

El efecto de las hormonas tiroideas es aumentar la transcripción de una gran cantidad de genes. Por consiguiente, en casi todas las células del organismo se sintetiza una elevada proporción de enzimas proteicas, proteínas estructurales, proteínas transportadoras y otras sustancias. El resultado neto al respecto es un aumento generalizado de la actividad funcional de todo el organismo. Otra función de las hormonas tiroideas es que activan receptores nucleares. Los receptores de estas hormonas se encuentran unidos a las cadenas genéticas de ADN o junto a ellas. Estas hormonas desempeñan una función de fundamental importancia en la diferenciación celular durante el desarrollo, y ayudan a conservar la homeostasis termogénica y metabólica en el adulto. (4). Hasta los momentos, no se tienen datos acerca del efecto de esta hormona en la proliferación de microorganismos.

Teniendo en cuenta los conocimientos que se tienen acerca del efecto de la insulina sobre el crecimiento de *E. coli* en medios de cultivo LB, el presente estudio se realizará para determinar si la presencia de las hormonas glucagon, cortisol y tiroxina también tienen algún efecto sobre el crecimiento de esta bacteria. La información que se obtenga con este estudio sería de utilidad en la terapia de aquellas enfermedades que requieran del tratamiento con alguna de estas hormonas y que además tengan susceptibilidad a las infecciones bacterianas.

MATERIALES Y MÉTODOS

TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación es de tipo experimental, ya que se controlaron o manipularon variables independientes (concentraciones de hormonas en el medio de cultivo) para analizar su efecto sobre el crecimiento celular (variable dependiente) de la bacteria *Escherichia coli*.

MUESTRA BIOLÓGICA

Para el estudio se utilizó la bacteria *E. coli*, cepa DH5- α transformada con el plásmido pTZDec-m, que le confiere resistencia a la ampicilina.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Cultivo de *E. coli* en presencia de las hormonas tiroxina, insulina, glucagón y cortisol.

Las bacterias se cultivaron aeróbicamente (agitación continua a 250 rpm) a 37°C en medio líquido Luria-Bertani (LB: Triptona 1%, Extracto de levadura 0,5%, Cloruro de sodio 1% y NaOH para neutralizar el pH) en presencia de ampicilina (100 μ g/ml). Para la realización de las curvas de crecimiento, bacterias procedentes de un cultivo saturado (14 horas de crecimiento), se inocularon en fioles con 20 ml de medio de cultivo ajustando la densidad óptica inicial a 600 nm (DO600) a un valor entre 0,05 y 0,1. Posteriormente, se adicionó a cada fiola de manera individual cantidades variables de insulina (0,06 - 2 Unidades/ml), glucagon (0,56 - 3,9 nM (nanoMolares)), cortisol (19 - 74 nM y tiroxina (0,1 - 10 nM). Las cantidades de hormona añadida fueron optimizadas para cada caso en el momento de la siembra. Paralelamente, se realizaron cultivos control a los cuales no se les adicionó ninguna hormona. El crecimiento celular se siguió midiendo la DO600 cada 30 minutos desde el momento de la inoculación, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (típicamente en 6-7 horas).

Análisis de proteínas y ácidos ribonucleicos celulares totales

Para analizar el perfil de proteínas y ácidos ribonucleicos, se recolectaron muestras de 2 ml de los cultivos en su fase logarítmica de crecimiento y se recuperaron las células por centrifugación a 5.000 rpm por 5 min a 4°C, en una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415 C. El paquete celular recuperado se lavó dos veces con resuspensión en tampón Tris-salino isotónico (NaCl 0,85%; Tris 50 mM, pH 7,5) y recentrifugación. Las células lavadas colectadas se resuspendieron en 100 μ l de SDS al 2% y la mezcla se incubó a 96°C por 10 minutos (períodos de incubación de un minuto seguido por 20 segundos de agitación por vortex) para liberar las proteínas celulares. La suspensión final se centrifugó a 14.000 x g por 15 minutos y se tomó el extracto celular para los análisis posteriores. La concentración de proteínas disueltas se estimó mediante tomando en cuenta que 0,15 OD600 del cultivo original son equivalentes a 40ug de proteínas presentes en los extractos celulares (16).

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida para observar el patrón de proteínas celulares de *E. coli*. Para ello, muestras de 30 μ g de proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (17), y el perfil electroforético se reveló por tinción con Azul de Coomassie. El perfil de ácidos ribonucleicos totales se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa, (18). Para ello, muestras de material extraído correspondientes a 20 μ g de proteínas fueron analizados en geles de agarosa al 1,2% y el perfil electroforético se reveló por tinción

con bromuro de etidio.

Las imágenes, digitalizadas en un GelDoc 1000 (BIORAD), de los geles de poliacrilamida teñidos fueron analizados mediante densitometría cuantitativa usando el programa "Multianalyst" (BIORAD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de las hormonas insulina, cortisol, glucagón y tiroxina sobre el crecimiento de *E. coli*.

Para determinar el efecto de las hormonas sobre el crecimiento de la bacteria *E. coli* cepa DH5- α transformada con el plásmido pTZDec-m, las mismas se cultivaron en medios de cultivo individuales de LB en presencia y en ausencia de diferentes concentraciones de las hormonas señaladas. El crecimiento se siguió midiendo la DO600 de los cultivos cada 30 minutos durante un tiempo de 400 minutos, como se indicó en la sección de Materiales y Métodos. Para cada una de las hormonas utilizadas se estimaron las diferencias de DO600 (Δ DO600) entre el cultivo con la hormona y el cultivo control en cada tiempo de medición y el porcentaje de estimulación con respecto al control ($[\Delta$ DO600 \times DO600(Control)]/ 100).

Efecto de la insulina

El efecto que causa la hormona insulina sobre el crecimiento celular se ve reflejado en la Figura 1, donde se muestran las curvas de crecimiento típicas para un cultivo sin la hormona (control) y para dos cultivos con dos de las concentraciones de insulina analizadas: 0,06 U/ml y 0,14 U/ml (Figura 1A). En este caso, se observa un efecto estimulador en forma dosis-dependiente en todo el período de crecimiento de la bacteria. Este efecto estimulador de la insulina se evidencia más claramente al analizar la Δ DO entre los cultivos con la hormona y el cultivo control (Figura 1B), y al estimar el porcentaje de estimulación con respecto al control para ambas concentraciones de hormona (Figura 1C). En este último caso, la hormona ejerció el mayor efecto estimulador a una concentración de 0,14 U/ml y a los 90 minutos de crecimiento, es decir,

en la fase logarítmica temprana, para luego disminuir su acción estimulante en la fase logarítmica tardía y estacionaria en donde los cultivos con hormona y el control alcanzan aproximadamente el mismo nivel de células.

Para determinar cuál es la concentración de insulina que ejerce el mayor efecto estimulante, se realizaron varias curvas de crecimiento en presencia de un rango de 0-2 U/ml de insulina y se determinó el porcentaje de estimulación con respecto al control en cada caso, a los 90 minutos de crecimiento. En la Figura 1D se muestran estos porcentajes versus las diferentes concentraciones de insulina; la hormona añadida al medio de cultivo a una concentración de 0,14 U/ml ejerció el mayor efecto estimulador sobre el crecimiento. Concentraciones mayores a ésta tienen un efecto estimulador menor sobre el crecimiento (un 30% menos que lo obtenido en presencia de 0,14 U/ml).

Los resultados antes mencionados demuestran el efecto estimulador de la insulina sobre el crecimiento de *E. coli*, el cual también ha sido encontrado en trabajos previos (10) donde estudiaron la capacidad que tiene la insulina de afectar la cinética del crecimiento microbiano. Los resultados indicaron que la capacidad de respuesta de las bacterias a la insulina está afectada por las concentraciones añadidas de la hormona a los medios de cultivo, observándose que el crecimiento se incrementa cuando se añaden glucosa e insulina al medio en bajas concentraciones.

Por otra parte, se ha demostrado que en presencia de la hormona se incrementa la velocidad de crecimiento en forma dosis-dependiente hasta en un 50% en la fase prelogarítmica, con 0,5 UI de insulina/ml de cultivo (11). También el efecto estimulador de la insulina sobre el crecimiento bacteriano en medio LB se ha observado en bacterias patógenas aisladas de úlcera de pie diabético como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium spp.* (12), donde se demostraron cambios notorios de las infecciones causadas por bacterias y hongos infecciosos oportunistas, cuya proliferación podría relacionarse en personas con desarreglos en la secreción hormonal prevalentes en la diabetes tipo 2.

Efecto del cortisol

El efecto del cortisol sobre el crecimiento celular se representa en la Figura 2 donde se muestran las curvas de crecimiento típicas para un cultivo sin la hormona (control) y para dos cultivos con dos de las concentraciones de cortisol analizadas: 19 y 37 nM (Figura 2A). La presencia de esta hormona en el medio de cultivo también ejerció un efecto estimulador en el crecimiento bacteriano durante todas las fases del crecimiento de la bacteria ya que se obtienen cambios favorables en el crecimiento al añadir la hormona con respecto al cultivo sin hormona (Figuras 2B). Este efecto estimulador fue más evidente en las fases más tempranas del crecimiento bacteriano (a los 60 minutos del cultivo) y en presencia de 37 nM de cortisol, donde el efecto estimulador fue de aproximadamente 30%

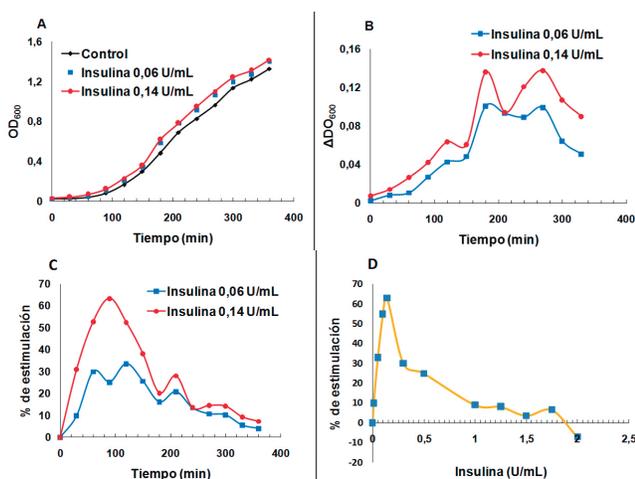


Figura 1. Crecimiento de *E. coli* en presencia de insulina. (A) Crecimiento de las bacterias en 20 ml de medio de cultivo LB en ausencia (Control) y en presencia de 0,06 y 0,14 U/ml de insulina. (B) Diferencias de DO600 (Δ DO600) entre los cultivos con hormona y el control, para cada tiempo de crecimiento. (C) Estimulación del crecimiento con respecto al control (% de estimulación) de 0,06 y 0,14 U/mL insulina. (D) Estimulación del crecimiento con respecto al control en presencia de diferentes concentraciones de insulina.

sobre el control (Figura 2C); el efecto estimulante disminuye un poco después de los 200 minutos del crecimiento alcanzando un nivel parecido al cultivo control.

El análisis del efecto del cortisol sobre el crecimiento de la bacteria en un rango de 0 hasta 80 nM, demostró que 37 nM es la concentración que ejerce el mayor efecto estimulador (Figura 2D) y dicha estimulación se mantiene aproximadamente constante hasta 80 nM.

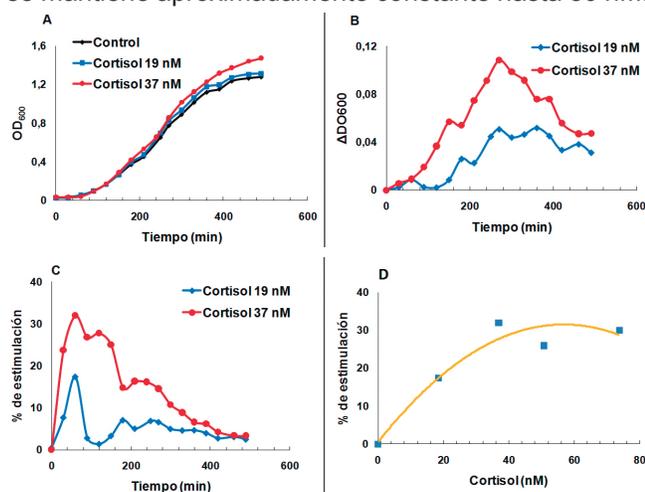


Figura 2. Crecimiento de *E. coli* en presencia de cortisol. (A) Crecimiento de las bacterias en 20 ml de medio de cultivo LB en ausencia (Control) y en presencia de 19 nM y 37 nM de cortisol. (B) Diferencias de DO600 ($\Delta DO600$) entre los cultivos con hormona y el control (C) Estimulación del crecimiento con respecto al control (% de estimulación) de 19 nM y 37 nM de cortisol. (D) Estimulación del crecimiento con respecto al control en presencia de diferentes concentraciones de cortisol.

No existen reportes en la literatura acerca del efecto del cortisol sobre el crecimiento in vitro de las bacterias. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que esta hormona ejerce un efecto estimulador sobre el crecimiento de *E. coli*, por lo que deben existir receptores a nivel del citoplasma bacteriano análogos a los que se encuentran en mamíferos. Esto implicaría también, que la pared y la membrana citoplasmática de la bacteria, permiten la difusión del cortisol al interior citoplasmático para unirse a su receptor. El efecto producido es semejante al obtenido con insulina, por lo que ambas hormonas deben activar genes relacionados con el ciclo celular.

Efecto del glucagon

El efecto del glucagon sobre el crecimiento celular se presenta en la Figura 3; se muestran las curvas de crecimiento típicas para un cultivo sin la hormona (control) y para un cultivo en presencia de 0,56 nM de la hormona (Figura 3A). El glucagon comercial (Laboratorios Lilly) contiene 1mg de glucosa y excipientes, los cuales están constituidos por lactosa (49 mg) y glicerina (12 mg); debido a que la *E. coli* es capaz de fermentar la lactosa de forma tardía, pudiendo utilizar este carbohidrato como fuente de nutrición, al cultivo control en este caso se le añadieron los mismos excipientes contenidos en la hormona comercial y a las mismas concentraciones en que estarían contenidos

en las diferentes cantidades de hormona utilizada en los cultivos.

El glucagon, al contrario que la insulina y el cortisol, ejerció un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli* con respecto al control (Figura 3B). Este efecto fue más acentuado durante los primeros 60 minutos del cultivo (Figura 3C), alcanzando casi un 25% de inhibición en el crecimiento a este tiempo. Sin embargo, al incrementar la concentración del glucagon hasta 5,6 nM el efecto inhibitorio disminuyó hasta que la hormona dejó de ejercer efecto alguno sobre el crecimiento (Figura 3D). Los resultados aquí obtenidos demuestran que la bacteria *E. coli* es sensible a esta hormona y que el efecto pareciera ser inhibir su crecimiento.

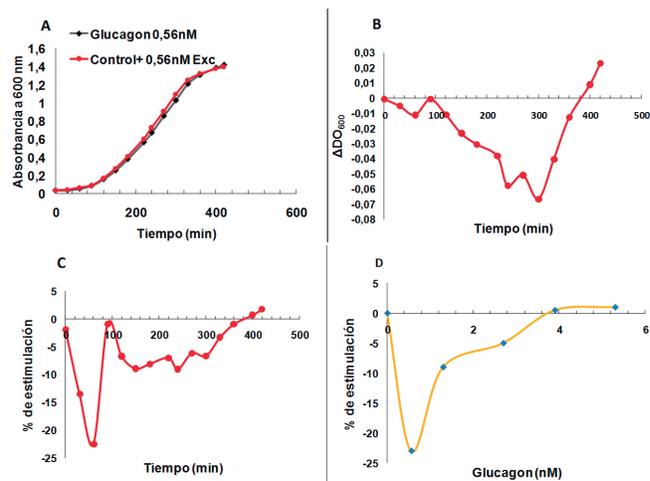


Figura 3. Crecimiento de *E. coli* en presencia de glucagon. (A) Crecimiento de las bacterias en 20 ml de medio de cultivo LB en ausencia (Control) y en presencia de 0,56 nM glucagon. (B) Diferencias de DO600 ($\Delta DO600$) entre los cultivos con hormona y el control (C) Estimulación del crecimiento con respecto al control (% de estimulación) de 0,56 nM glucagon. (D) Estimulación del crecimiento con respecto al control en presencia de diferentes concentraciones de glucagon.

Lo antes expuesto sugiere, que también pudiesen existir receptores para el glucagon a nivel de la membrana citoplasmática de estas bacterias. No existen reportes acerca del efecto del glucagon sobre el crecimiento bacteriano, pero en eucariotas unicelulares como la levadura, se encontró que esta hormona es capaz de inhibir el crecimiento celular de *S. cerevisiae* en un rango de concentraciones entre 14 y 574 nM (13), en condiciones aeróbicas y en medio rico, mostrando una actividad antagonista a la insulina que previamente se demostró como estimulante del crecimiento de este hongo (14). En el presente estudio, también se observó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria *E. coli* pero sólo cuando se utilizaron concentraciones bajas de la hormona (0-3 nM). La insulina y el glucagon son hormonas antagonistas del metabolismo de los carbohidratos en mamíferos, y los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que también son antagonistas para afectar el crecimiento de la en *E. coli*. Esto podría determinarse con mayor claridad en estudios futuros añadiendo estas dos hormonas juntas en los medios de cultivo de *E. coli* para ver el efecto sobre el crecimiento.

Efecto de la tiroxina

El efecto que causa la hormona tiroxina sobre el crecimiento celular se presenta en la Figura 4 donde se muestran las curvas de crecimiento típicas para el cultivo control y para dos cultivos en presencia de 1 y 10 nM de la hormona (Figura 4A). Las diferencias entre los cultivos con la hormona y el control, indican una tendencia inhibitoria de la hormona sobre el crecimiento (Figura 4B) en los primeros 100 minutos de crecimiento en presencia de la hormona, como se expresa en la Figura 4C.

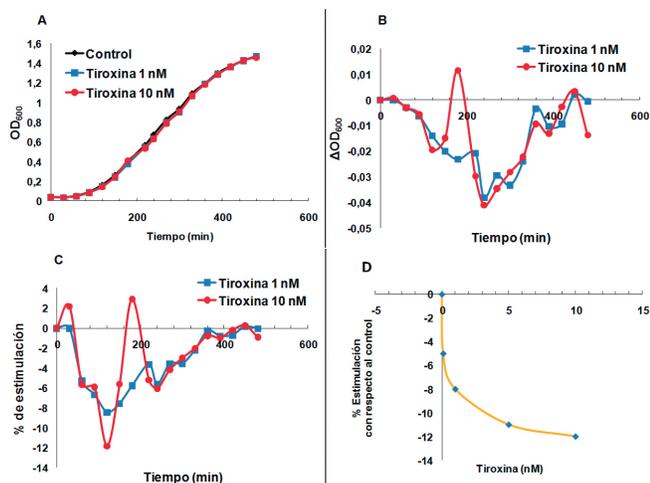


Figura 4. Crecimiento de *E. coli* en presencia de tiroxina (A) Crecimiento de las bacterias en 20 ml de medio de cultivo LB en ausencia (Control) y en presencia de 1 nM y 10 nM tiroxina. (B) Diferencias de ΔOD_{600} ($\Delta \Delta OD_{600}$) entre los cultivos con hormona y el control (C) Estimulación del crecimiento con respecto al control (% de estimulación) de 1 nM y 10 nM tiroxina. (D) Estimulación del crecimiento con respecto al control en presencia de diferentes concentraciones de tiroxina.

Al igual que para el cortisol y el glucagón, no existen trabajos previos donde se haya evaluado el efecto de la tiroxina sobre el crecimiento bacteriano. Si bien para las hormonas precedentes analizadas, se pudo discernir un efecto estimulador (en el caso de la insulina y el cortisol) o inhibitorio (en el caso del glucagón), los resultados obtenidos para la tiroxina sugieren que probablemente esta hormona no tenga un efecto significativo sobre el crecimiento de *E. coli*, es decir, que la adición de diferentes concentraciones de tiroxina no ejerce un efecto relevante sobre la velocidad de crecimiento de la bacteria.

Efecto de las hormonas insulina, cortisol, glucagón y tiroxina sobre la expresión de polipéptidos totales de *E. coli*.

Los resultados anteriores indican que la insulina, el cortisol y el glucagón afectan el crecimiento de *E. coli*, lo cual es indicativo de que estas hormonas actúan a nivel de la expresión genética de la bacteria *E. coli*. Para identificar con detalle el efecto de las hormonas a este nivel, se analizó el patrón de polipéptidos celulares totales de la bacteria. Para ello se tomaron muestras de 2 ml de los medios de cultivo en presencia o en ausencia de las hormonas, en la fase logarítmica tardía (entre 200 a 300 minutos).

El perfil típico de polipéptidos que resulta de la separación en geles de poliácridamida al 10% de 30 μ g de proteínas totales de un extracto celular de *E. coli* crecidas en medio LB sin hormonas (control), se muestra en la Figura 5. En este perfil se observan bandas que corresponden a polipéptidos comprendidos en un rango entre 225 y 10 kDa, que pertenecen a proteínas expresadas por el genoma de *E. coli* y que son características de todos los extractos celulares analizados (Figura 5A). Para analizar cuantitativamente este perfil, se realizó un análisis densitométrico de la imagen digitalizada del gel. En la Figura 5B se muestra el densitograma integrado del perfil polipeptídico mostrado en la Figura 5A, donde se pueden identificar 29 bandas correspondientes a los polipéptidos. Mediante este densitograma se puede obtener la proporción (porcentaje de las áreas de cada banda) en la que se encuentran los polipéptidos de acuerdo a su intensidad en el gel.

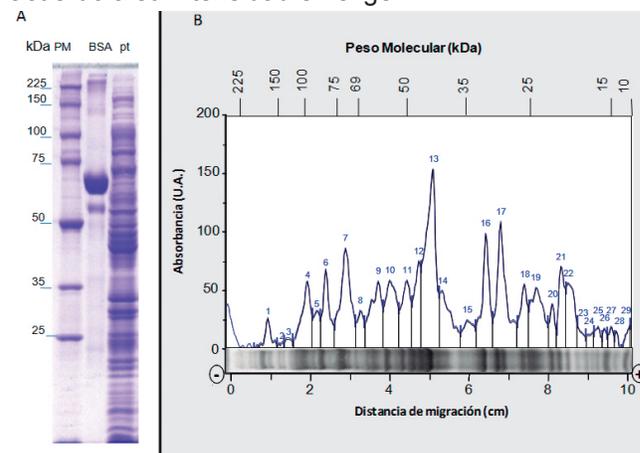


Figura 5. Perfil de polipéptidos celulares totales de *E. coli*. (A) Separación en gel de poliácridamida al 10% de 30 μ g de proteínas totales (pt) teñidas con azul de Coomassie (PM: marcador de pesos moleculares; BSA: albúmina bovina). (B) Análisis densitométrico del gel mostrado en (A), cada banda (1 al 29) es correspondiente a la integración de las proteínas separadas de acuerdo a su intensidad en el gel.

Efecto de la insulina sobre el patrón de polipéptidos

Se compararon los densitogramas integrados de los polipéptidos de los extractos de bacterias cultivadas en un rango de 0 a 2 U/ml de insulina. El densitograma correspondiente a los polipéptidos de los extractos provenientes de los cultivos con 1,5 U/ml de insulina (Figura 6A), fue el que mostró mayor variación en la proporción de polipéptidos por efecto de la insulina con respecto al control, siendo los correspondientes a las bandas indicadas (sombreadas en azul) los que presentaron las mayores variaciones. En la figura 6B se muestra un ejemplo sobre la variación del porcentaje respecto al control con la concentración de la hormona, para tres polipéptidos representativos. Se observa como la estimulación (banda 17) o inhibición (banda 15) dependen de la concentración de la hormona en los ensayos. También se muestra en porcentaje de un polipéptido que no es afectado por la hormona (banda 9).

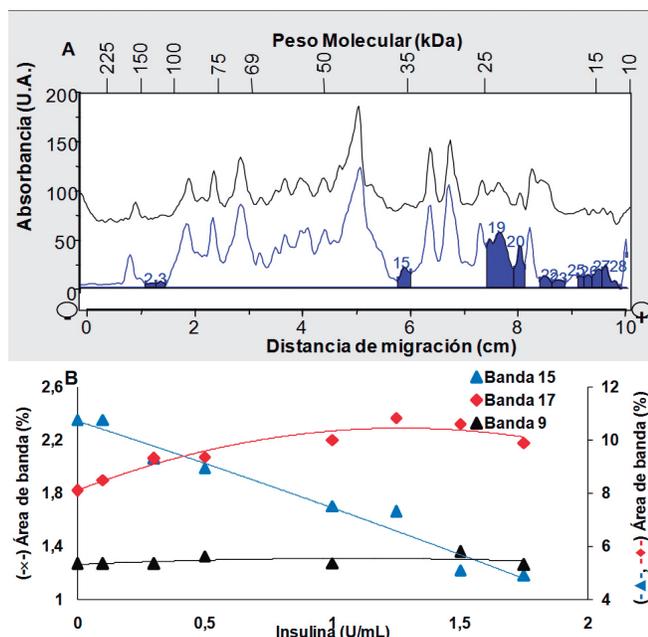


Figura 6. Efecto de la insulina sobre los polipéptidos celulares de E. coli. (A) Densitometría del gel de poliacrilamida al 10% correspondiente a las proteínas de E coli crecidas en ausencia (control) y en presencia de 1,5 U/ml de Insulina. Se indican en azul las bandas que presentaron los mayores porcentajes de estimulación o inhibición con respecto al control. (B) Efecto de la insulina sobre la variación en la proporción (% de área) de las bandas de polipéptidos correspondientes a las bandas indicadas

Los polipéptidos que presentaron mayor estimulación (alrededor o más del 40% respecto al control) por efecto de la insulina fueron los pertenecientes a las bandas 19, 20, 26, 27 y 28, (PM aproximado a 24, 21, 16, 15 y 14 KDa), esta última presentó el porcentaje más alto de estimulación (229%). También hubo polipéptidos cuya expresión fue fuertemente inhibida por efecto de la insulina, donde destacan los correspondientes a las bandas 2, 3, 15, 22, 23 y 25 (PM aproximado a 137, 124, 36, 19, 18 y 17 KDa) que presentaron una inhibición superior o igual al 40%.

Esta variación en la proporción de las proteínas expresadas por la bacteria al estar en contacto directo con la insulina, indica una modificación de la expresión de los polipéptidos inducida por la hormona. Esta modificación también se encontró previamente (11) quienes determinaron que la expresión de algunas proteínas por la E. coli cultivadas en presencia de insulina, variaba (aumentaba o disminuía) a lo largo del crecimiento de la bacteria, y que esta variación estaba relacionada con las necesidades metabólicas de la bacteria en cada fase del crecimiento y con procesos de comunicación bacteriana.

Se puede inferir cuáles son las posibles proteínas que corresponden a las bandas que presentaron mayores variaciones, comparando sus pesos moleculares estimados con los de las proteínas del genoma completo de E. coli. De acuerdo a esto, los polipéptidos que presentaron mayor estimulación en su expresión con la hormona (14-22KDa),

pueden corresponder a proteínas implicadas en la división celular y a reguladores de operones y de la transcripción. La inhibición de las bandas de alto peso molecular (137, 124 KDa), alrededor de 36 KDa y de 19-17 KDa pueden corresponder a factores y enzimas específicas que intervienen también en la transcripción y traducción como la sintetasa de ARNt, activadores de la transcripción, transportadores de aminoácidos y ARN polimerasa. En algunos trabajos realizados en eucariotas se ha reportado una inhibición de manera específica de la transcripción y traducción al activarse el proceso de división celular.

Efecto del cortisol sobre el patrón de polipéptidos

El cortisol añadido a los cultivos en un rango de 0 a 80 nM, también afectó la proporción de algunos polipéptidos expresados por la bacteria (Figura 7A). El densitograma correspondiente a los extractos provenientes de los cultivos con 37 nM de cortisol fue el que mostró mayor variación en el patrón de polipéptidos, siendo los correspondientes a las bandas indicadas en la Figura 7A, los que presentaron las mayores variaciones con respecto al control. En la figura 7B se muestra también un ejemplo de variación de estimulación (banda 1: 184 KDa), o de inhibición (banda 18: 26KDa) respecto al control dependiente de la concentración de la hormona, y de un polipéptido (banda 7: 71 KDa) que no es afectado por el cortisol. Se destaca la banda 1 (184 KDa) cuya expresión está fuertemente incrementada (149% con respecto al control) y las bandas 2, 3 y 15 (137, 124 y 36 KDa) que mostraron estimulaciones superiores al 40% (datos no mostrados). Por otra parte, se observó inhibición en la expresión de los polipéptidos correspondientes a las bandas 18, 24, 25 y 26 (26, 17, 16,5 y 16KDa).

Los resultados anteriores indican que el cortisol, al igual que la insulina, afecta la expresión de los polipéptidos en la bacteria E coli. Algunos de los polipéptidos afectados por el cortisol lo son también por la insulina y en la mayoría de ellos el efecto de ambas hormonas sobre la expresión de proteínas es antagónico (resultados no mostrados). Este efecto no es extraño pues ambas hormonas son antagónicas en varias rutas metabólicas. El efecto de mayor estimulación del cortisol fue sobre la banda 1, la cual corresponde a polipéptidos de 153-215 KDa, entre los cuales se encuentran las adhesinas y otras proteínas de membrana, que pueden estar relacionadas con el desarrollo de virulencia. Los polipéptidos que resultaron más fuertemente inhibidos por el cortisol fueron los correspondientes a las bandas 25 y 26, entre los cuales se encuentran reguladores de la transcripción y enzimas para la síntesis de desoxiribonucleótidos y fosfolípidos.

Efecto del glucagon sobre el patrón de polipéptidos

El glucagon añadido a los cultivos en un rango de 0 a 5,3 nM, también afectó diferencialmente la proporción

de algunos polipéptidos expresados por la bacteria, dependiendo de las concentraciones utilizadas de la hormona. La concentración de la hormona que produjo mayor variaciones en la proporción de polipéptidos expresados por la bacteria fue la de 2,7 nM, siendo los correspondientes a las bandas indicadas en la Figura 8 los que presentaron las mayores variaciones con respecto al control. La expresión de la mayoría de estos polipéptidos correspondientes a las bandas está fuertemente estimulada por el glucagón (más del 60% sobre el control) y sólo uno (banda 12) presentó una fuerte inhibición (-72% con respecto al control) (datos no mostrados).

Los resultados anteriores indican que el glucagón también afecta la expresión de polipéptidos en *E. coli*, aunque el número de polipéptidos afectados fue menor que en el caso de la insulina y del cortisol. Algunos de los polipéptidos afectados por el glucagón también lo son por la insulina. Los polipéptidos estimulados correspondientes a las bandas anteriores (PM 137, 19, 16, 15 y 14KDa) pueden corresponder a proteínas de membrana, adenilato kinasa, y reguladores de operones y de la transcripción. El polipéptido que es inhibido (47 KDa) pueden corresponder a enzima metabolizante de aminoácidos para obtener energía.

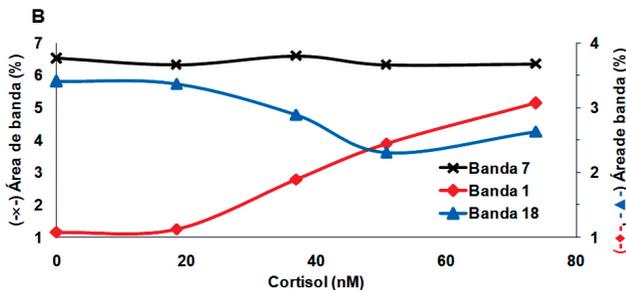
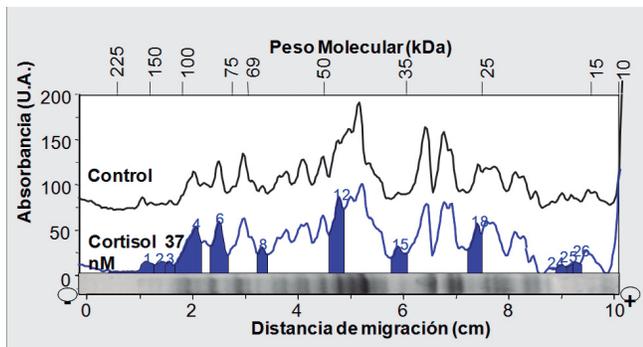


Figura 7. Efecto del cortisol sobre los polipéptidos celulares de *E. coli*. (A) Densitometría del gel de poliacrilamida al 10% correspondiente a las proteínas de *E. coli* crecidas en ausencia (control) y en presencia de 37 nM de cortisol. Se indican en azul las bandas que presentaron los mayores porcentajes de estimulación o inhibición con respecto al control. (B) Efecto del cortisol sobre la variación (% de área) de las bandas de polipéptidos correspondientes a las bandas indicadas.

En mamíferos el glucagón actúa para aumentar los niveles de glucosa sanguínea cuando hay escases de nutrientes, estimulando la degradación del glucógeno y la gluconeogénesis. Por analogía con las células de eucariotes, la sensibilidad de la bacteria *E. coli* a la hormona debería interpretarse momentáneamente como una señal de bajo estatus nutricional, por lo

tanto, deben activarse componentes que garanticen la sobrevivencia celular, como por ejemplo enzimas que regeneran ATP, y al mismo tiempo deben inhibirse los procesos anabólicos.

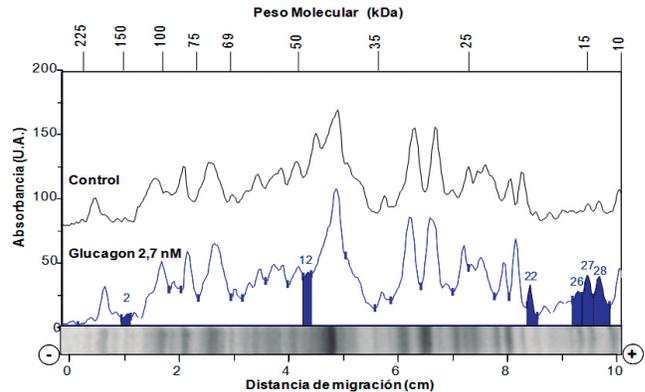


Figura 8. Efecto del glucagón sobre los polipéptidos celulares de *E. coli*. Densitometría del gel de poliacrilamida al 10% correspondiente a las proteínas de *E. coli* crecidas en ausencia (control) y en presencia de 2,7 nM de glucagón. Se indican en azul las bandas que presentaron los mayores porcentajes de estimulación o inhibición con respecto al control.

Efecto de la tiroxina sobre el patrón de polipéptidos

La comparación de los densitogramas de los polipéptidos obtenidos de las bacterias crecidas en medios de cultivo con concentraciones de tiroxina en un rango de 0 a 10 nM, mostró poca variabilidad en cuanto a las proporciones de los polipéptidos expresados por la bacteria. Sin embargo, se encontraron algunas variaciones cuando las bacterias se cultivaron en presencia de 2 nM de tiroxina. El densitograma correspondiente al perfil polipeptídico mostró que las principales variaciones se encontraron en los polipéptidos representados por las bandas 5 y 26 (Figura 9), las cuales tuvieron una estimulación de 25% y 35% con respecto al control (datos no mostrados).

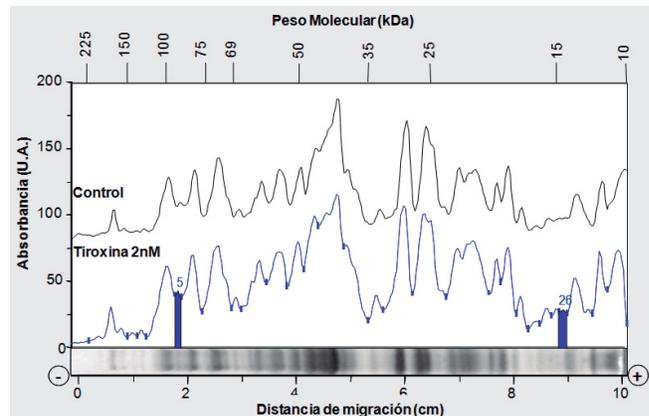


Figura 9. Efecto de la tiroxina sobre los polipéptidos celulares de *E. coli*. Densitometría del gel de poliacrilamida al 10% correspondiente a las proteínas de *E. coli* crecidas en ausencia (control) y en presencia de 2 nM de tiroxina. Se indican en azul las bandas que presentaron los mayores porcentajes de estimulación o inhibición con respecto al control.

El efecto de la tiroxina sobre el perfil de polipéptidos de *E. coli*, es muy bajo en comparación con el de las otras hormonas. Esto podría estar relacionado con el efecto poco significativo que la tiroxina ejerció sobre el crecimiento de la bacteria (Figura 4), sería necesario

realizar más estudios para determinar el verdadero efecto de esta hormona sobre la expresión genética de la bacteria.

Efecto de las hormonas insulina, cortisol, glucagon y tiroxina sobre el patrón de ácidos ribonucleicos totales de la *E. coli*.

Los resultados anteriores demuestran que la insulina, el cortisol y el glucagon tienen efectos bien definidos sobre la expresión de polipéptidos (y por lo tanto sobre la expresión genética) de la bacteria *E. coli*. Con la finalidad de determinar si estas hormonas también afectan la expresión genética a nivel de otros ARNs celulares, como por ejemplo de los ARNs ribosomales (ARNr), se realizó el análisis de los ácidos ribonucleicos totales mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2 % tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. Este análisis se realizó en los extractos de las células obtenidas de los cultivos en presencia de las concentraciones de hormonas que produjeron las principales variaciones en la expresión de polipéptidos y en los cultivos control. Los resultados mostraron la presencia de las bandas de los ARNr bacterianos 23S (2904 nt) y 16S (1542 nt) y algunas bandas tenues de más de 2000 pb, que corresponden a las diferentes conformaciones del plásmido (pTZDec-m) que contiene la bacteria *E. coli* utilizada (Figura 10).

El perfil de los ARNr de los extractos de células crecidas en presencia de 1,5 U/ml de insulina es muy similar al de los de las células crecidas en ausencia de la hormona, lo cual indica que la insulina no afectó la cantidad ni la integridad de los ARNr de la bacteria. Similares resultados se obtuvieron en el perfil de los ARNr de los extractos obtenidos de las células crecidas en presencia de 37 nM cortisol; 2,7 nM glucagon y 2 nM tiroxina. Estos resultados indican que las hormonas estudiadas no tienen efecto significativo sobre los ARNr de la *E. coli*.

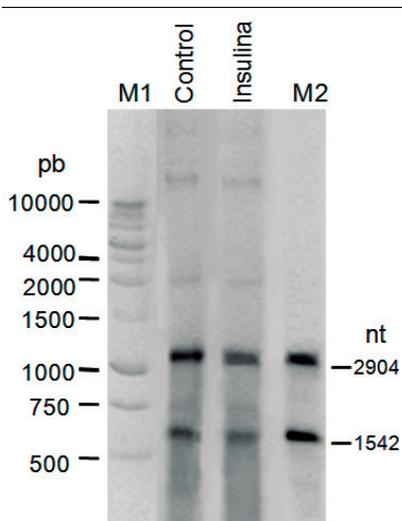


Figura 10. Análisis electroforético de los ARNr de *E. coli*. 20 μ g de proteínas provenientes de los extractos celulares crecidos en ausencia (control) y en presencia de 1,5 U/ml de insulina se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio. M1 y M2: patrones de tamaño molecular para ADN (pb) y para ARN (nt).

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Murray, P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. Editorial ELSEVIER. 5ta Edición. Madrid; 2006
- Brooks G, Butel J, Morse S. Microbiología medica. Editorial El Manual Moderno. 18a Edición. México; 2005
- Joklik W, Willett H, Amos D, Eilfert C. Zinsser Microbiología. Editorial Médica Panamericana. 20a Edición. Buenos Aires; 1995
- Harrison T, Longo D, Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hausser S, cols. Principios de Medicina Interna. McGraw Hill Interamericana. 16a Edición. Madrid; 2002
- Surette M, Miller M, Bassler B. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella thymurium* and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible of autoinducer production. PNAS 1999; 96:1639- 1644.
- Miller M, Bassler B. Quórum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol 2001; 55:165-199.
- Klosowska K, Plotkin B. Human insulin modulation of *Escherichia coli* adherence and chemotaxis. Am J Infect Dis 2006; 2(4): 197-200.
- Guyton A. y Hall J. Tratado De Fisiología Médica. Editorial ELSEVIER. 11a Edición. Madrid; 2006
- Ferreira de Souza A, Lopez J. Insulin or Insulin-like studies on unicellular organism: a review. Braz Arch Biol Tech 2004; 6(47): 973-981.
- Plotkin B, Viselli S. Effect of Insulin on Microbial Growth. Curr Microbiol Int J 2000; 41:60-64.
- Hernández V, Infante F, Rojas R, Ferreras AC, Ramírez N, Tovar E, Triana-Alonso F.J. 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; 2008 (en prensa).
- Triana P, De Freitas A, Gómez K. 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 "Witremundo Torrealba", FCS-UC; 2008
- Figuera M, García L. Efectos de las Hormonas Insulina y Glucagon en el Crecimiento Celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo especial de grado para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis, Escuela de Bioanálisis, FCS-UC; 2006
- Reggio R, Camargo H, Bastidas A, Ferreras A, Bandeira E, Triana-Alonso F, Triana J. Efecto de la insulina en el crecimiento celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Anales de Investigación. Memorias del IV Congreso de Investigación en la Universidad de Carabobo y I Congreso de Postgrado en la Universidad de Carabobo, Tomo I, T: 427. 2002
- Rady M, Johnson D, Patel B, Larson J, Helmers R. Corticosteroids influence the mortality and morbidity of acute critical illness. Critical Care 2006; 10(4).
- Sambrook J, Russel D. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3ra Edición. New York; 2001
- Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
- Ogden RC, Adams DA. Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. Meth Enzymol 1987; 152: 61-87