

Artículo original

Efecto de la insulina humana sobre el crecimiento y expresión de proteínas celulares de *Klebsiella pneumoniae* aislada de pie diabético

Carla Sarco-Lira^a, Ana Celia Ferreras^a, Paula Triana^a, Dayana Requena^{a,b}, Juana Ledia Triana^{a,*}, Francisco Triana-Alonso^(†)

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana Alonso" (BIOMED-UC), Facultad de Ciencias de la Salud.

^bDepartamento Clínico Integral, Escuela de Bioanálisis. Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Venezuela.

Recibido 26 de enero de 2015; aceptado 14 de octubre de 2015

Resumen: Algunos microorganismos patógenos aumentan su proliferación al cultivarlos en presencia de insulina, por lo tanto, la hiperinsulinemia podría influir sobre las infecciones de pacientes diabéticos. En este trabajo se determinó el efecto de la insulina sobre el crecimiento y expresión de proteínas celulares de *Klebsiella pneumoniae* aislada de pie diabético. Las bacterias se cultivaron en medio Luria-Bertani en presencia o en ausencia de insulina humana. El crecimiento se determinó midiendo la DO_{600} de los cultivos hasta alcanzar la fase estacionaria; se colectaron bacterias a diferentes tiempos para extraer sus proteínas celulares (extractos) y analizarlas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y densitometría cuantitativa. En presencia de insulina (0,5 U/mL) el crecimiento bacteriano se incrementó en 40% respecto al control en las fases logarítmica temprana y media. Todos los perfiles electroforéticos de los extractos mostraron 27 bandas polipeptídicas (rango 150-9 kDa). La expresión del 41% de estas bandas aumentó en los extractos de las bacterias cultivadas con insulina, respecto a los controles, mientras que la expresión del 22% disminuyó. Los resultados indicaron que la insulina incrementó la proliferación y moduló la expresión genética de *K. pneumoniae*, sugiriendo que la hiperinsulinemia podría favorecer la severidad de infecciones en pacientes diabéticos.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, insulina, diabetes mellitus, crecimiento bacteriano.

Effect of human insulin on growth and cellular protein expression of *Klebsiella pneumoniae* isolated from diabetic foot infections

Abstract: Some pathogens increase their proliferation when cultured in the presence of insulin, therefore, hyperinsulinemia may influence diabetic infections. In this work we determine the effect of insulin on growth and cellular protein expression from *Klebsiella pneumoniae* isolated from diabetic foot infections. Bacteria were grown in Luria-Bertani medium in the presence and absence of human insulin. Growth was determined by measuring OD_{600} of the cultures until reached the stationary phase. In order to extract cellular proteins, bacteria were collected at different times to obtain extracts that were analyzed by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels and quantitative densitometry. In the presence of insulin (0.5 U/mL) bacterial growth increased by 40% compared with control in the early and middle logarithmic phase. All electrophoretic profiles of the extracts showed 27 polypeptide bands (range 150-9 kDa). The expression of 41% of these bands increased in extracts from bacteria grown with insulin when compared with controls, whereas protein expression decreased by 22%. The results indicated that insulin increased *K. pneumoniae* proliferation and modulated gene expression, suggesting that hyperinsulinemia could contribute to the severity of the infections in diabetic patients.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, insulin, diabetes mellitus, bacterial growth.

* Correspondencia:

E-mail: lediatriana@yahoo.es

Introducción

Diversos estudios describen la existencia de proteínas que se unen a la insulina o de péptidos semejantes a ésta en una amplia gama de especies, incluyendo protozoarios, hongos

unicelulares y bacterias; además, en estos microorganismos también se han encontrado respuestas funcionales a la insulina de mamíferos [1,2]. Esto indica que la hormona podría causar los mismos efectos, tanto en los microorganismos como en las células de eucariotas superiores, tales como

regulación de un gran número de procesos metabólicos que incluyen la captación y metabolización de la glucosa, metabolismo de lípidos, síntesis de proteínas y promoción de la división y crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos [3,4]. En el caso de las bacterias, los principales estudios se han realizado en *Escherichia coli*, donde se encontraron evidencias de la presencia de una sustancia con cierta similitud biológica e inmunológica a la insulina de mamíferos [5]. Por otra parte, se ha demostrado que la insulina humana incrementa el crecimiento de esta bacteria en medios de cultivo líquidos como Mueller Hinton o Luria-Bertani (LB), estimula su adherencia a células epiteliales y produce cambios en el nivel de expresión de algunas de sus proteínas citoplasmáticas [6-8]. Estos estudios indicaron que la insulina humana moduló la proliferación y expresión genética de *E. coli*, los cuales son factores que podrían incidir en su nivel de virulencia.

En los humanos, las alteraciones en la respuesta celular a la insulina o la resistencia a la acción de esta hormona, que finalmente afectan su síntesis y secreción, conducen al desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), una de las enfermedades metabólicas más prevalentes y cuya característica principal es la hiperglicemia crónica [4]. Los pacientes con DM2 presentan numerosas complicaciones, entre ellas, la susceptibilidad a contraer infecciones en los miembros inferiores, denominadas comúnmente pie diabético. Estas infecciones por lo general tienen una mayor complejidad y resistencia a los tratamientos que las observadas con características similares en pacientes no diabéticos [9].

El hecho de que la insulina humana afecte la proliferación de una bacteria patógena para el humano puede tener gran relevancia clínica, sobre todo en el caso de las infecciones en los pacientes con DM2. Existe la posibilidad de que la condición de hiperinsulinemia, asociada con frecuencia a la DM2, y también a los estados iniciales de las infecciones agudas, pueda tener alguna relación con dicha severidad. Por lo tanto, resulta de gran interés estudiar el efecto de la insulina sobre otras bacterias patógenas relacionadas con infecciones en pacientes diabéticos, como es el caso de *Klebsiella pneumoniae*. Esta bacteria está asociada a infecciones respiratorias, del tracto urinario y de tejidos blandos, ocupando el segundo lugar, después de *E. coli*, como causa de bacteriemia por gramnegativos [10]. *K. pneumoniae* representa uno de los principales patógenos aislados en infecciones de pacientes diabéticos y por ello constituye uno de los microorganismos más interesantes para analizar su comportamiento en presencia de insulina. Por esta razón, en el presente trabajo se estudió el efecto de la insulina humana sobre el crecimiento y el nivel de expresión de proteínas citoplasmáticas de una cepa de *K. pneumoniae* aislada de pie diabético, y cultivada en medio líquido.

Materiales y métodos

Cultivo bacteriano: Se utilizó una cepa de *K. pneumoniae*,

aislada de úlceras de pie diabético, identificada mediante pruebas bacteriológicas de tipificación convencionales y criopreservada en medio líquido LB (Tryptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 1%, ajustado a un pH de 7 con NaOH) con 50% de glicerol, a -80 °C. Cultivos de 30 mL de medio LB fueron inoculados con bacterias procedentes de un preinóculo fresco, ajustando a una concentración inicial de 1×10^7 células/mL equivalente a 0,05 unidades de densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). Los cultivos se realizaron en ausencia (control) o en presencia de concentraciones variables (0,1-0,5) Unidades Internacionales (UI/mL) de insulina humana de secuencia regular y acción rápida (Humulin® R, Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), con agitación constante (200 rpm/min) a 37 °C. El crecimiento celular se siguió midiendo la DO_{600} en los cultivos y/o por conteo de células en una cámara de Neubauer, realizando un total de 10 ensayos independientes.

Extracción y análisis de las proteínas celulares de *K. pneumoniae*: Las bacterias cultivadas en las condiciones antes descritas fueron colectadas en diferentes tiempos del crecimiento, centrifugando los cultivos a 5.000 rpm por 10 min. El sedimento bacteriano se lavó dos veces con solución isotónica (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 0,85% p/v) y se recuperó nuevamente por centrifugación. Al sedimento final se le añadieron 200 μ L de dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% y la suspensión obtenida se incubó con agitación a 96 °C durante 10 min [7]. La suspensión fue centrifugada (15.000 x g, 15 min) y al sobrenadante (extracto celular) se le determinó la concentración de proteínas mediante el método de Lowry [11]. Se llevaron a cabo cuatro ensayos independientes para el análisis de las proteínas. Las proteínas presentes en los extractos celulares se analizaron mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida) al 12,5% en condiciones desnaturalizantes [12]. Luego de su tinción con Azul de Coomassie, las imágenes digitalizadas de los geles se analizaron mediante densitometría cuantitativa en un equipo GelDoc1000 (BIORAD), usando el programa Multianalyst (BIORAD) version 7.1.

Análisis estadístico: Se trabajó con medidas de tendencia central, determinándose el promedio y desviación estándar del crecimiento celular y de la expresión de proteínas citoplasmáticas, y utilizando los datos de 10 y 4 ensayos independientes, respectivamente. El análisis del crecimiento celular se realizó en 12 tiempos diferentes del cultivo y se probaron cuatro concentraciones de insulina y el control sin la hormona como variables independientes. El análisis de la expresión de proteínas citoplasmáticas se llevó a cabo en 10 tiempos diferentes del cultivo bacteriano, en la presencia de la concentración de insulina donde se observó el máximo efecto en la proliferación celular y en el control. Para verificar si existían diferencias significativas entre todos los tratamientos (con insulina y control) y rechazar la hipótesis nula, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) en cada tiempo del cultivo. La comparación entre los diferentes tratamientos con insulina y el control, tanto para el

crecimiento celular como para la expresión de proteínas en cada tiempo del crecimiento bacteriano, se realizó aplicando la prueba de diferencias de medias de Dunnett. También se aplicó la prueba de múltiples comparaciones de Tukey para establecer las diferencias significativas entre todos los tratamientos (con insulina y control). Valores de p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95%. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el software Statistix 8.0 para Windows.

Resultados

Efecto de la insulina humana sobre el crecimiento de K. pneumoniae: La figura 1A muestra la curva típica del crecimiento bacteriano en presencia de insulina (0,5 UI/mL) y en ausencia de la hormona durante un lapso de 360 min. Se observó un incremento en el crecimiento por efecto de la hormona, el cual se inició desde la fase prelogarítmica (0-60 min) y se mantuvo a lo largo de toda la fase logarítmica (~60-240 min), observándose la diferencia con el control aún en la

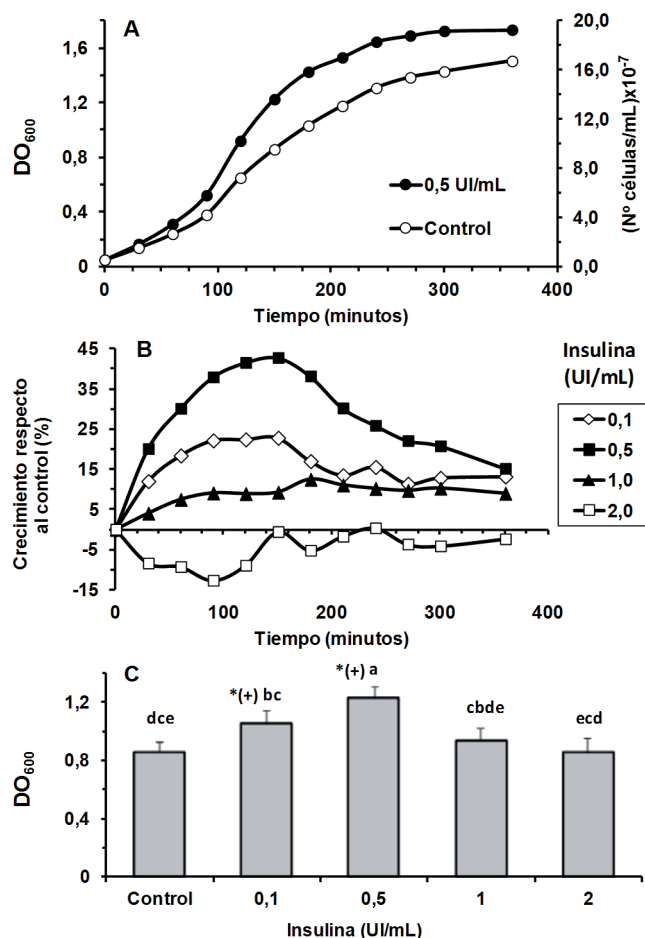


Figura 1. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de *K. pneumoniae*. (A) Curvas de crecimiento bacteriano del control y con 0,5 UI/mL de insulina. (B) Porcentajes de crecimiento respecto al control durante todo el período del cultivo y en presencia de las concentraciones de insulina indicadas. (C) DO₆₀₀ a los 150 min de los cultivos del control y en presencia de las diferentes concentraciones de insulina. Promedio con sus desviaciones estándar de diez cultivos independientes. Prueba de Tukey ($p < 0,05$): letras iguales indican grupos homogéneos. Prueba de Dunnett: *(+) positivamente significativo respecto al control ($p < 0,05$).

fase estacionaria (>240 min). Según el análisis de varianza y la prueba de Dunnett, las diferencias con el control fueron significativamente superiores ($0,0030 \leq p \leq 0,0195$) desde los 90 hasta los 360 min del crecimiento celular.

Los porcentajes del crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de insulina, respecto al control (Figura 1B), mostraron que los cultivos que contenían 0,1 y 0,5 UI/mL de la hormona presentaron las mayores estimulaciones significativas sobre el control según las pruebas aplicadas de comparaciones múltiples ($0,0031 \leq p \leq 0,0348$), con máximos alrededor de 20% y 40% respectivamente. Estas estimulaciones se produjeron aproximadamente entre los 90 y 150-180 min del cultivo, los cuales correspondían a las fases logarítmicas temprana y media, respectivamente. El porcentaje máximo sobre el control con la concentración de 1 UI/mL de insulina fue alrededor de 10% desde los 90 min del crecimiento y no fue significativo ($p > 0,05$). Los cultivos con 2 UI/mL de insulina tampoco produjeron diferencias significativas en el crecimiento al compararlas con el control ($p > 0,05$), aunque se observó una tendencia inhibitoria que podría indicar que a concentraciones elevadas de la hormona el efecto estimulante sobre la proliferación celular disminuye. En la figura 1C se muestra un ejemplo de los promedios de las DO₆₀₀ de varios cultivos con y sin la insulina, a un tiempo de crecimiento 150 min, donde se observaron estimulaciones máximas y significativas sobre el control con 0,1 y 0,5 UI/mL según el análisis de varianza y la prueba de Dunnett ($p = 0,0032$). La prueba de Tukey también indicó, a este tiempo del cultivo, que la estimulación con 0,5 UI/mL fue significativamente superior a la observada con 0,1 UI/mL ($p < 0,05$). No hubo diferencias con el control para 1 y 2 UI/mL de insulina ($p > 0,05$).

Efecto de la insulina sobre la expresión de proteínas celulares de K. pneumoniae: El análisis electroforético de las proteínas celulares totales, de bacterias del control y cultivadas en presencia de la concentración de insulina de mayor efecto en la proliferación (0,5 UI/mL), se observa en la figura 2. El perfil electroforético fue similar para todos los extractos analizados a los diferentes tiempos del cultivo, mostrando un aproximado de 27 bandas polipeptídicas en el rango de 150 a 9 kDa, las cuales variaron en sus intensidades de acuerdo al tiempo del cultivo (Figura 2A). Los densitogramas correspondientes mostraron variaciones en varias bandas presentes en los extractos de las bacterias cultivadas en presencia de insulina, respecto al control, como se muestra en el ejemplo de la figura 2B a los 90 minutos del crecimiento celular.

Los porcentajes de área en los densitogramas, que indican la variación cuantitativa de las bandas polipeptídicas, mostraron que la hormona puede estimular o inhibir significativamente la expresión de varias bandas a lo largo del crecimiento bacteriano, según el análisis de varianza y prueba de Dunnett ($0,0011 \leq p \leq 0,0450$), (Figura 3). Por ejemplo, la expresión de las bandas de 145, 90, 66 y 30 kDa, fue estimulada por la insulina, principalmente en las etapas

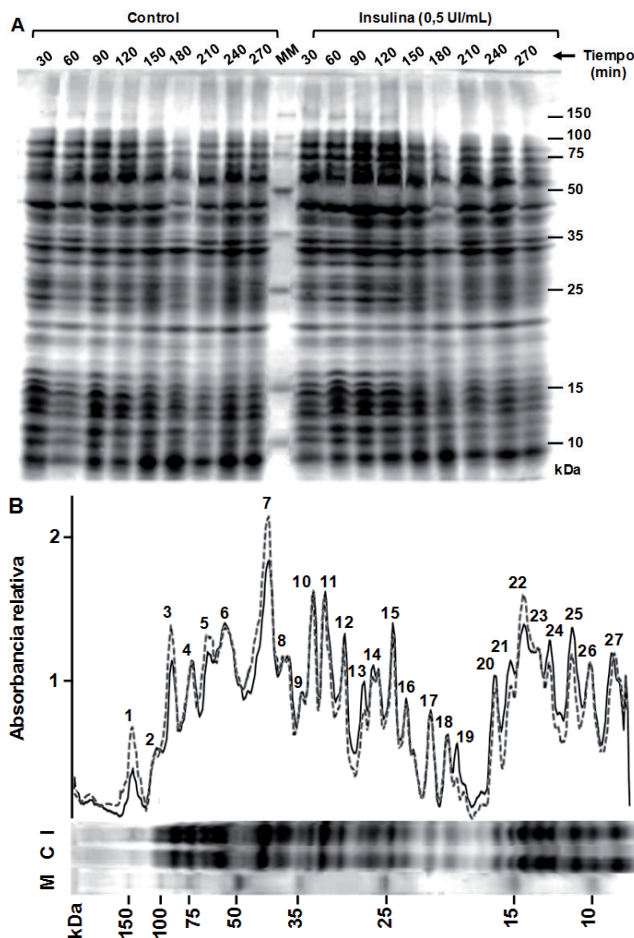


Figura 2. Análisis electroforético y densitométrico de los extractos celulares de *K. pneumoniae*. (A) Perfil electroforético obtenido por tinción con Azul de Coomassie, de 20 µg de proteínas de los extractos celulares de bacterias cultivadas en ausencia (Control) y en presencia de insulina (0,5 UI/mL); (B) Perfil electroforético de los extractos celulares a los 90 minutos del crecimiento celular [Control (C); insulina (I); Marcadores de peso molecular en kDa (M)] y los respectivos densitogramas de los perfiles electroforéticos, mostrando las diferentes bandas identificadas (1→27). Control (—); Insulina (---).

prelogarítmica y logarítmica temprana y media (~20-150 minutos) del crecimiento bacteriano, tendiendo a ser similar la expresión en ambos cultivos en la etapa logarítmica tardía ($0,398 \leq p \leq 0,9497$ (Figuras 3A→D)). De manera contraria, la expresión de las bandas de 35, 28, 12 y 11 kDa, fue inhibida por la hormona, principalmente en la etapa logarítmica del crecimiento bacteriano (Figuras 3E→I). Por otra parte, la expresión de otras bandas (ejemplo: 75, 55, 32 y 19 kDa) no fue afectada significativamente ($0,6248 \leq p \leq 0,9713$) por la hormona durante todo el crecimiento celular (Figuras 3J→M).

Del total de las 27 bandas detectadas, la expresión de 41% de ellas (entre 145 y 13 kDa) fue significativamente estimulada por la insulina respecto al control ($0,0011 \leq p \leq 0,0415$), mientras que la expresión del 22% (entre 35 y 11 kDa), fue disminuida por la hormona ($0,0184 \leq p \leq 0,0450$) (Tabla 1). El mayor efecto estimulante de la insulina fue sobre las bandas de 145, 66, 18 y 16 kDa, con incrementos en la expresión respecto al control dentro del rango de 126 a 41%, mientras que la estimulación en el resto de las bandas

estuvo entre 20 y 30%. Valores similares a este rango se encontraron en la mayoría de las bandas cuya expresión fue disminuida por la hormona.

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que *K. pneumoniae* es sensible a la insulina humana y que la hormona tiene un efecto estimulante sobre la proliferación de esta bacteria en medio líquido LB, dependiente de su concentración y del tiempo de crecimiento bacteriano en los cultivos. La variación en la expresión de algunas proteínas celulares de las bacterias, que fueron cultivadas en presencia de la hormona, es indicativo de su efecto sobre la expresión genética, bien sea a nivel de la transcripción de genes específicos o de la traducción de los ARNm correspondientes. Efectos similares se han reportado previamente en *E. coli* [7], otra enterobacteria asociada a infecciones frecuentes en pacientes diabéticos, por lo que probablemente sea un efecto general de la hormona sobre este tipo de bacterias.

Por otra parte, estos resultados apoyan la hipótesis de que la condición de hiperinsulinemia, frecuente en los pacientes con DM2 como respuesta fisiológica a la resistencia a la insulina, o por un descontrol en los tratamientos aplicados que conllevan al mismo cuadro hiperinsulinémico [13], puede favorecer el crecimiento bacteriano.

En mamíferos, la insulina ejerce su acción sobre las células diana luego de unirse a su receptor, lo cual induce cambios conformacionales y la autofosforilación de un número de residuos de tirosina de dicho receptor. Esta activación del receptor desencadena una cascada de señalización intracelular que conduce al control directo de la actividad de diversas enzimas metabólicas por eventos de fosforilación/desfosforilación [14]. Además de este efecto directo sobre la actividad enzimática, la insulina regula la expresión genética de diversas enzimas involucradas en la captación de glucosa y aminoácidos, en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, el crecimiento, desarrollo y supervivencia celular [3].

Los resultados obtenidos del análisis del perfil de las proteínas celulares de *K. pneumoniae* indicaron que la hormona, probablemente por interacción con algún tipo de receptor en la membrana celular bacteriana y a través de un mecanismo aún no descrito, ejercería su efecto a nivel de la expresión genética de esta bacteria, lo cual se evidenció en la variación de la proporción del 63% de las bandas polipeptídicas detectadas en los extractos celulares de las bacterias cultivadas en presencia de insulina, con respecto al control. El efecto de la hormona sobre la expresión genética fue principalmente estimulante, reflejándose en el incremento del nivel de diferentes proteínas celulares en un amplio rango de pesos moleculares (Tabla 1). Dentro de este rango se podrían ubicar proteínas relacionadas con el metabolismo de la bacteria en general, lo cual explicaría el mayor crecimiento observado en los cultivos en presencia de insulina. Se pueden hacer algunas conjeturas de posibles

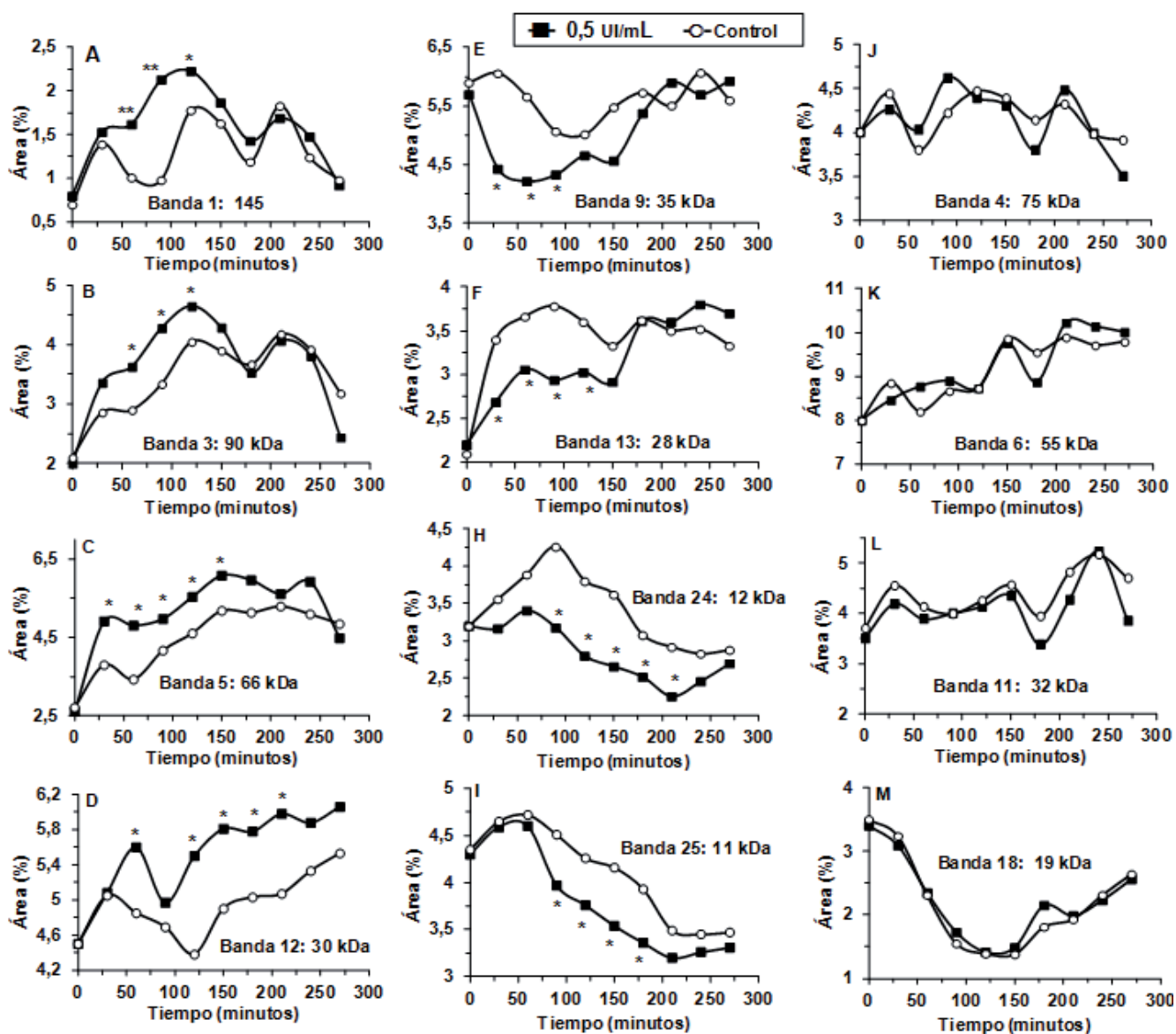


Figura 3. Efecto de la insulina sobre la expresión de varias bandas polipeptídicas de *K. pneumoniae* durante el crecimiento celular. Se representa el porcentaje de área de las respectivas bandas proteicas, obtenidos por densitometría cuantitativa de la separación electroforética de los extractos celulares de bacterias cultivadas en ausencia (Control) y en presencia de 0,5 UI/mL de insulina, frente al tiempo del crecimiento celular. Los valores corresponden al promedio de los datos de cuatro cultivos independientes para ambas condiciones. Prueba de Dunnett: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. (A→D) Bandas estimuladas por la insulina. (E→I) Bandas disminuidas por la insulina. (J→M) Bandas no afectadas por la insulina.

identidades, comparando los pesos moleculares estimados para cada banda con los de las proteínas reportadas para el genoma completo de *K. pneumoniae* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=Klebsiella+pneumoniae>). De acuerdo a esta comparación, y considerando los nutrientes presentes en el medio de cultivo utilizado, en el rango de pesos moleculares de las bandas estimuladas por la insulina se podrían encontrar proteínas involucradas en el crecimiento bacteriano en general y por tanto requeridas en: replicación y transcripción del ADN, traducción del ARNm, metabolismo de aminoácidos, transducción de señales, fosforilación oxidativa y generación de energía, biogénesis de membrana y transporte intracelular. Resulta interesante que, dentro de las bandas estimuladas por la hormona, pudieran también encontrarse proteínas relacionadas con la

virulencia bacteriana. Con base a este análisis, en las bandas 3 (90 kDa), 12 (30 kDa), 15 (24 kDa), 19 (18 kDa) y 20 (16 kDa) (Tabla 1) se podrían ubicar proteínas involucradas en el ensamblaje de fimbrias, y en la banda 12 enzimas del tipo betalactamasas.

Entre las proteínas probables, cuya expresión fue disminuida por la insulina, podrían encontrarse enzimas que catalizan las rutas anaeróbicas y de degradación de ácidos grasos para obtener energía, proteínas que inhiben la actividad traduccional, proteínas que reprimen la reparación de ADN y la sobrevivencia de la célula, así como enzimas involucradas en la muerte celular programada. En mamíferos se ha descrito que la insulina inhibe la apoptosis celular bajo ciertas condiciones [15] y en bacterias se han descrito mecanismos que intervienen en la muerte celular

Tabla 1. Bandas polipeptídicas de *K. pneumoniae* cuya expresión fue afectada por la presencia de insulina en el medio de cultivo.

Nº de Banda	PM (kDa)	Control área (%)	Insulina área (%)	Máximo efecto respecto al control (%)	Tiempo del máximo efecto (min)
1	145	0,98 ± 0,23	2,13 ± 0,43	**119 ± 17	90
2	103	1,27 ± 0,15	1,63 ± 0,23	*29 ± 7	60
3	90 ^F	3,34 ± 0,42	4,28 ± 0,47	*28 ± 2	90
5	66	3,42 ± 0,30	4,80 ± 0,27	*41 ± 7	60
7	46	3,5 ± 0,26	4,21 ± 0,26	*21 ± 2	90
9	35	5,66 ± 0,47	4,22 ± 0,51	*- 27 ± 3	60
12	30 ^{FB}	4,38 ± 0,29	5,5 ± 0,50	*25 ± 5	120
13	28	3,78 ± 0,19	2,94 ± 0,1	*-22 ± 3	90
15	24 ^F	2,83 ± 0,31	3,66 ± 0,46	*29 ± 7	180
17	22	2,19 ± 0,14	1,63 ± 0,28	*-26 ± 9	210
19	18 ^F	1,32 ± 0,32	2,04 ± 0,39	**56 ± 11	210
20	16 ^F	0,47 ± 0,12	1,07 ± 0,25	**126 ± 12	210
21	15	2,69 ± 0,20	2,11 ± 0,27	*-22 ± 6	90
22	14	2,13 ± 0,29	2,71 ± 0,2	*28 ± 9	120
23	13	3,21 ± 0,23	3,96 ± 0,07	*24 ± 7	240
24	12	3,8 ± 0,2	2,8 ± 0,44	*-27 ± 8	120
25	11	4,16 ± 0,32	3,54 ± 0,15	*-15 ± 4	150

Los porcentajes de área corresponden a la densitometría cuantitativa de la separación electroforética de extractos celulares de bacterias cultivadas en ausencia (Control) y en presencia de 0,5 UI/mL de insulina. Los valores corresponden al promedio de los datos de cuatro cultivos independientes para ambas condiciones. Prueba de Dunnett: **p<0,01; *p<0,05. ^FEntre las proteínas probables se encontrarían algunas involucradas en la biosíntesis y estructura de fimbrias. ^BEntre las proteínas probables se encontrarían betalactamasas. Se indica en negrillas las bandas cuya proporción disminuyó en presencia de insulina.

programada [16], por lo tanto, la hormona podría estar ejerciendo el mismo efecto en *K. pneumoniae*.

Los resultados también mostraron que la insulina regula de forma variante la expresión proteica durante el crecimiento bacteriano (Figura 3). Esto sugiere que la acción de la hormona sobre la expresión genética pudiera estar relacionada con la densidad poblacional y la variación de las condiciones del medio de cultivo, como por ejemplo la disponibilidad de nutrientes, a medida que avanza el crecimiento de las bacterias. En este sentido, se determinó que el efecto de la insulina humana sobre la proliferación de *E. coli* en un cultivo en medio líquido, dependía de la disponibilidad de glucosa en el medio y de la concentración inicial de bacterias que son expuestas a la hormona, por lo que se sugirió que la insulina actuaría de manera análoga a las moléculas involucradas en el sistema de comunicación intercelular *quorum sensing* (QS) [6]. Este tipo de comunicación es mediado por autoinductores (AI), que son

secretados por las bacterias dependiendo de la densidad poblacional, para regular la expresión de diversos genes, entre ellos los involucrados en la esporulación, formación de biopelículas y producción de factores de virulencia, entre otros, beneficiándose la población bacteriana de forma general y sincronizada [17].

Se ha demostrado que hormonas del hospedador pueden cruzar señales con las del QS y modular la expresión genética de las bacterias, un proceso que se ha denominado comunicación inter reino [18]. Un ejemplo de este proceso fue descrito para una cepa enterohemorrágica de *E. coli*, donde se demostró que la epinefrina estimulaba la expresión de un tipo de autoinductor (AI-3) implicado en la expresión de genes relacionados con su virulencia [19]. Por lo tanto, el mecanismo de acción de la insulina para modular la expresión genética en *K. pneumoniae* de forma variante durante el crecimiento bacteriano, también podría estar relacionado con el sistema QS.

Como se mencionó anteriormente, algunas de las bandas polipeptídicas estimuladas por la insulina podrían corresponder a proteínas involucradas en la biosíntesis de fimbrias, implicadas en la adherencia de *K. pneumoniae* a tejidos y formación de biopelículas [20], y a enzimas del tipo betalactamasas (Tabla 1). Este hecho resulta de gran interés ya que tendría consecuencias directas en su patogenicidad. La posibilidad de una mayor expresión de proteínas fimbriales por efecto de la insulina en *K. pneumoniae*, está reforzada por resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, que indican que la hormona también incrementa la adherencia y formación de biopelículas (datos no publicados). Por otra parte, la posibilidad de un incremento en la expresión de betalactamasas estaría relacionada directamente con el desarrollo de la resistencia a los antibióticos. El principal mecanismo de resistencia de *K. pneumoniae* es la producción de betalactamasas, y en este sentido se ha reportado un incremento significativo de aislados que producen betalactamasas de espectro extendido en América Latina [21]. Si la insulina estimula la expresión de este tipo de enzimas, la hiperinsulinemia en un paciente diabético con una infección por *K. pneumoniae* podría favorecer aún más la resistencia a los antibióticos, dificultando el abordaje terapéutico.

La mayor susceptibilidad y severidad de las infecciones bacterianas en pacientes con DM2 ha sido atribuida principalmente a la hiperglicemia, la cual contribuye al desarrollo de disfunciones en el sistema inmune, como la disminución de la actividad de los neutrófilos, del sistema antioxidante y de la inmunidad humoral, así como al desarrollo de neuropatías y de micro y macro angiopatías [9]. Igualmente, se ha planteado que la hiperglicemia influye directamente en la virulencia bacteriana [22]. Sin embargo, la respuesta innata del sistema inmune de los pacientes diabéticos en las etapas iniciales de una infección, sería ineficiente ante el rápido incremento de la población bacteriana y la producción de factores de virulencia, como consecuencia de los estados de hiperinsulinemia que se pueden presentar en la DM2.

Los resultados de este trabajo demostraron que la insulina humana incrementa la proliferación celular y regula la expresión genética de *K. pneumoniae* aislada de pie diabético, de manera similar a lo observado en otras enterobacterias, por lo que podría representar un efecto general de la hormona sobre este tipo de microorganismos. Por lo tanto, la deducción inmediata de estos resultados es que la condición de hiperinsulinemia en los individuos que padecen DM2 podría influir directamente en la susceptibilidad a contraer infecciones y en su severidad. A su vez, esta relación sugiere la importancia de comprender los mecanismos que rigen la señalización de la insulina en las bacterias patógenas, ya que ello permitiría la optimización terapéutica de dichas infecciones, incluyendo, posiblemente, la modificación de los métodos de análisis de sensibilidad antimicrobiana en muestras de pacientes diabéticos y el diseño de tratamientos que bloqueen el efecto hormonal sobre los microorganismos.

Agradecimientos

Al laboratorio “Delgado Launois” de la Clínica Lugo, Maracay, estado Aragua, Venezuela, por el aislamiento e identificación de la cepa bacteriana utilizada en este estudio. Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación (FONACIT), Proyecto N° 2012001228. Algunos datos forman parte de la tesis para la Licenciatura en Biología de Carla F. Sarco-Lira. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Referencias

1. Ferreira de Souza MA, López JA. Insulin or insulin-like studies on unicellular organisms: a review. *Braz Arch Biol Technol.* 2004; 47:973-81.
2. Triana JL, Triana-Alonso F, González G, Lozano G, Reggio R, Ferreras AC y col. 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.* 2011; 31:48-56.
3. Rhodes CJ, White MF. Molecular insights into insulin action and secretion. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32:3-13.
4. Lin Y, Sun Z. Current views on type 2 diabetes. *J Endocrinol.* 2010; 204:1-11.
5. Le Roith D, Shiloach J, Heffron R, Rubinovitz C, Tanenbaum R, Roth J. Insulin-related material in microbes: similarities and differences from mammalian insulins. *Can J Biochem Cell Biol.* 1985; 3:839-49.
6. Plotkin BJ, Viselli SM. Effect of insulin on microbial growth. *Curr Microbiol.* 2000; 4:60-4.
7. Hernández V, Infante F, Rojas R, Ferreras AC, Ramírez, N, Triana-Alonso FJ. 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, Venezuela. 2008; Tomo I: 473-8.
8. Klosowska K, Plotkin B. Human insulin modulation of *Escherichia coli*. Adherence and chemotaxis. *Am J Infect Dis.* 2006; 2:197-200.
9. Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus: a review of pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012; 16 Suppl 1:S27-36.
10. Perianes-Díaz M, Novo-Veleiro I, Solís-Díaz K, Prolo-Acosta A, García-García I, Alonso-Claudio G. Bacteriemia por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido: factores asociados a mortalidad y reingreso hospitalario. *Med Clin.* 2014; 142:381-6.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-75.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-5.
13. Shanik MH, XU Y, Krha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. Insulin resistance and hyperinsulinemia. Is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care.* 2008; 31 Suppl 2:S262-8.
14. Lizcano JM, Alessi DR. The insulin signaling pathway. *Curr Biol.* 2002; 12: R236-8.
15. Parcellier A, Tintignac LA, Zhuravleva E, Hemmings BA. PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal.* 2008; 20:21-30.
16. Lewis K. Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64:503-4.
17. Jimenez JC, Federle MJ. Quorum sensing in group A *Streptococcus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4:1-16.
18. Hughes T, Sperandio V. Inter-kingdom signaling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6:111-20.
19. Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2003; 100:8951-6.
20. Johnson JG, Murphy CN, Sippy J, Johnson TJ, Clegg S. Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol.* 2011; 193:3453-60.
21. Guzmán-Blanco M, Labarca JA, Villegas MV, Gotuzzo E. Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz J Infect Dis.* 2014; 18:421-33.
22. Ching-Ting Lin, Yu-Ching Chen, Tzyy-Rong Jinn, Chien-Chen Wu, Yi-Ming Hong, Wen-Hao Wu. Role of the cAMP-dependent carbon catabolite repression in capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2013; 8:e54430. DOI: 10.1371/journal.pone.0054430.