

Artículo original

Efecto de la insulina en *Saccharomyces cerevisiae*: estimulación de la actividad enzimática de piruvato quinasa, expresión de proteínas citoplasmáticas y proliferación celular

Juana Ledia Triana^{b,d,*}, Francisco Triana-Alonso^{c,d}, Gilabert González^a, Gabriela Lozano^a, Ronald Reggio^{b,d}, Ana Celia Ferreras^d, Eduardo Bandeira^d, Luis Manuel Pérez-Ybarra^{b,d}

^aDepartamento Clínico Integral, Escuela de Bioanálisis, ^bDepartamento de Ciencias Básicas, Escuela de Bioanálisis, ^cDepartamento de Fisiología y Bioquímica, Escuela de Medicina, ^dInstituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UC). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Venezuela.

Recibido 7 de febrero de 2011; aceptado 18 de mayo de 2011

Resumen: La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es sensible a la insulina de mamíferos y actúa en el metabolismo de carbohidratos. Sin embargo, no hay estudios de su efecto en las enzimas glucolíticas de este microorganismo. Este trabajo demuestra que la insulina estimula la actividad de piruvato quinasa en *S. cerevisiae* durante su crecimiento en medio rico suplementado con glucosa y en condiciones aeróbicas. En la fase logarítmica temprana, la máxima estimulación sobre el control se observó en presencia de 3 μM de insulina (actividad específica: 701 U/mg proteína, 404% de estimulación; actividad absoluta: 1,73 U/10⁶ células, 652% de estimulación), sugiriendo un efecto sobre la regulación de la expresión genética de la enzima. La presencia de 1,2-3 μM de la hormona estimuló en 51-68% la expresión de las proteínas citoplasmáticas y, a concentraciones mayores (4,5-9 μM), también estimuló en 25-32% la proliferación celular, indicando hiperplasia e hipertrofia celular de acuerdo a la concentración de la insulina en el medio. El efecto de la hormona disminuyó en la fase logarítmica tardía de crecimiento, sugiriendo un periodo de acción, posiblemente por un mecanismo regulatorio dependiente de nutrientes. Este sistema puede servir como modelo para estudiar muchos de los efectos moleculares de la insulina no conocidos aún.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, insulina, piruvato quinasa, proliferación celular.

Insulin effect in *Saccharomyces cerevisiae*: stimulation of pyruvate kinase activity, cytoplasmatic proteins expression and cell proliferation

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* yeast is sensitive to mammal's insulin and acts in carbohydrate metabolism. Nevertheless, there are no studies of its effects on the glycolytic enzymes of this microorganism. This study shows that insulin stimulates pyruvate kinase activity in *S. cerevisiae* during its growth in rich glucose supplemented media, and under aerobic conditions. In the early logarithmic phase, the maximum stimulation over control was seen in presence of 3 μM insulin (specific activity: 701 U/mg protein, 404% stimulation; absolute activity: 1.73 U/10⁶ cells, 652% stimulation), suggesting an effect over the regulation of the genetic expression of the enzyme. The presence of 1.2-3 μM of insulin stimulated the expression of cytoplasmic proteins in 51-68% and at higher concentrations (4.5-9 μM) it also stimulated cell proliferation in 25-32%, indicating cell hyperplasia and hypertrophy according to the hormone concentration in the medium. The effect of the insulin decreased in the late logarithmic growth phase, suggesting a period of action, possibly due to a nutrient dependent regulatory mechanism. This system can serve as model to study many of the molecular effects of insulin not yet known.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, insulin, pyruvate kinase, cell proliferation.

* Correspondencia:
E-mail: lediatriana@yahoo.es

Introducción

La insulina es una hormona peptídica producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas y regula muchos de los procesos vitales en los mamíferos.

En el mecanismo de acción de la insulina se distinguen dos rutas de señalización: la vía del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), y la vía mitogénica de la Ras-MAP quinasa. La hormona regula la expresión de una cantidad de genes a nivel transcripcional y traduccional relacionados con los

procesos de transporte de glucosa, glucogénesis, glucólisis, lipogénesis, antilipólisis, antiapoptosis y los involucrados en el ciclo celular que controlan el crecimiento y diferenciación [1,2]. La mayor parte de los efectos de la insulina se llevan a cabo a través del sistema proteico FRAP/mTOR (mTORC1) dentro de las rutas de señalización. Este complejo proteico ha sido catalogado como un sensor de las condiciones del medio, y al ser activado por la insulina y nutrientes estimula la síntesis de proteínas en las etapas de iniciación y de elongación [3,4]. La hiperactividad del complejo se ha involucrado con la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 [5]. El metabolismo de la hormona y la enzima degradante de insulina (IDE) también se han relacionado con el mal de Alzheimer y diabetes mellitus tipo 2 [6,7].

La insulina regula la actividad de varias enzimas del metabolismo de los carbohidratos; una de ellas es la piruvato quinasa, controlada también por carbohidratos y ácidos grasos poliinsaturados. La función de la enzima es catalizar la conversión irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato en el paso final de la glucólisis. La piruvato quinasa es codificada por dos genes cuyos productos son varias isoformas tejido-específicas y dependientes del desarrollo, nutrientes y hormonas [8]. La expresión de la piruvato quinasa es activada por la insulina y la glucosa a través de los factores transcripcionales que interactúan con elementos de respuesta al esterol (SREBP-1c) y carbohidratos (ChREBP) respectivamente [9,10]. Sin embargo, el mecanismo exacto de regulación de la enzima por la hormona no se conoce aún. En este sentido, hay varios trabajos que han utilizado a la levadura *S. cerevisiae* para estudiar los efectos de la insulina de mamíferos, debido a la homología funcional que existe entre ellos y la ventaja que representa la manipulación de un sistema unicelular [11-17].

La levadura *S. cerevisiae* es sensible a la insulina humana a través de un complejo proteico de membrana que actúa de manera similar al de eucariotas superiores, e interviene en el metabolismo de carbohidratos [16,17]. Sin embargo, en la literatura no hay reportes que describan el efecto de la hormona sobre la piruvato quinasa de este microorganismo. El estudio de la regulación de la piruvato quinasa por la insulina tiene especial importancia, porque es una de las enzimas clave en la velocidad de la glucólisis en humanos y se ha propuesto como una de las posibles enzimas cuyas mutaciones pueden originar resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 [18]. Por otra parte, el estudio del efecto de las hormonas de mamíferos en microorganismos ha tenido especial interés en los últimos años, por su posible relación con el grado de virulencia. En el caso de la diabetes tipo 2, la patología se caracteriza por presentar un estado de hiperinsulinemia-hiperglicemia casi constante y múltiples infecciones, por lo que se ha planteado la posibilidad de un efecto directo de la insulina del huésped sobre la proliferación y resistencia de microorganismos [19]. Considerando los aspectos anteriores, en este trabajo se estudió el efecto de la insulina humana sobre la actividad enzimática de la piruvato quinasa de la levadura *S. cerevisiae* en un medio rico en nutrientes y en condiciones

aeróbicas. El análisis se realizó en dos etapas de la fase logarítmica de crecimiento con la finalidad de establecer los cambios en la regulación de la actividad enzimática por la hormona. También se determinó el efecto de la insulina sobre la expresión de las proteínas totales citoplasmáticas y el crecimiento celular. Los resultados obtenidos permitirán establecer un sistema apropiado en la levadura *S. cerevisiae* para estudiar diversos aspectos moleculares sobre la acción de la insulina y establecer la correspondiente homología con mamíferos, así como analizar posibles mecanismos de señalización microorganismo-huésped.

Materiales y métodos

Cultivo de *S. cerevisiae*: En los ensayos se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* A364A. El número de células inicial en todos los medios de cultivo fue de 6×10^3 /mL. La levadura creció con agitación constante a 230 rpm (incubador NewPruns-Wick), en condiciones aeróbicas, a una temperatura de 30 °C y en 150 mL de un medio rico (YM-1) que contenía (g/L): ácido succínico (5), NaOH (3), adenina (0,001), uracilo (0,001), bases nitrogenadas con aminoácidos (3,5), glucosa (10) (todos marca Sigma), extracto de levadura (2,5) (Difco) y peptona (5) (Difco). El crecimiento se siguió por medidas de densidad óptica a 660 nm (DO_{660}) y conteo de células. Los cultivos fueron recolectados para obtener las fracciones citoplasmáticas a un tiempo de crecimiento de 15 horas, correspondiente a una DO_{660} de 0,2 para el control (fase logarítmica temprana), y a 20 horas, correspondiente a una DO_{660} de 0,8 para el control (fase logarítmica tardía). La insulina (cristalina, ADN recombinante 100 U/mL, marca Lilly) fue agregada en el medio de cultivo en el momento del inóculo a concentraciones variables: 0,3; 1,2; 3; 4,5; 6 y 9 μ M.

Obtención de la fracción citoplasmática: Las células fueron homogenizadas en un mortero durante 15 minutos con nitrógeno líquido (se agregó a intervalos de 3 minutos) y en un buffer conteniendo 20 mM Hepes-KOH pH 7,48; 100 mM acetato de potasio; 3 mM acetato de magnesio y 2 mM ditiotreitól (todos marca Sigma). El homogenizado fue centrifugado durante 5 minutos a 3.000 rpm en una centrifuga Eppendorf y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm durante 15 minutos para obtener la fracción citoplasmática. Se determinaron las proteínas totales en cada extracto por el método de Lowry [20].

Determinación de la actividad de piruvato quinasa: La actividad enzimática se determinó por un ensayo indirecto. El piruvato, formado gracias a la reacción catalizada por la piruvato quinasa a partir de PEP y ADP, es reducido a lactato, consumiendo NADH en una segunda reacción catalizada por un exceso de lactato deshidrogenasa (LDH). En condiciones de saturación de la piruvato quinasa, la velocidad inicial de disminución de la absorbancia a 340 nm correspondiente al NADH ($\Delta A_{340}/\text{min}$) es proporcional a la actividad enzimática absoluta presente en el extracto celular

[21]. Cada ensayo de actividad de la enzima se realizó a una temperatura de 25°C y en un volumen final de 100 μL con los siguientes componentes: en ausencia y presencia del sustrato (PEP 20 mM), volúmenes variables de los extractos celulares y correspondientes a: 3, 6, 12, 21 y 30 mg% de proteínas, Hepes 15 mM pH 7,5; MgCl_2 10 mM; KCl 50 mM; ADP 4 mM; NADH 0,5 mM y LDH 0,02 U/ μL . Todos los componentes se añadieron en una celda espectrofotométrica y se leyeron las absorbancias a 340 nm durante 1 hora. Empleando el coeficiente de extinción molar del NADH ($6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) se calculó la actividad enzimática. Para la cuantificación respectiva se definió una unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un nanomol de piruvato, y por ende promueve el consumo de un nanomol de NADH por minuto a 25°C. En cada fracción citoplasmática se determinó la actividad enzimática específica (a.e. = U/mg proteínas) y la actividad enzimática absoluta (a.a. = U/ 10^6 células).

Análisis estadístico de los datos: Se utilizó el análisis de varianza (ANAVAR). Las comparaciones entre todos los tratamientos se llevaron a cabo usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para las comparaciones contra el control se utilizó la prueba de medias de Dunnett, y para las comparaciones de los tratamientos entre las fases se utilizó la prueba para contrastes ortogonales de Scheffé. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el software Statistix 8.0 para Windows.

Resultados

Efecto de la insulina en la actividad enzimática de piruvato quinasa en los extractos citoplasmáticos de S. cerevisiae: En la figura 1A se muestra un ejemplo de las cinéticas de reacción en la fase logarítmica temprana de crecimiento, utilizando una concentración de 3 mg% de proteínas de los extractos citoplasmáticos obtenidos de las levaduras cultivadas en ausencia de insulina (control) y en presencia de 3 μM de la hormona. También se muestra el ensayo cinético sin el sustrato (PEP) en la mezcla de reacción, donde se observa que la absorbancia se mantuvo constante en el tiempo, indicando la ausencia de una cantidad significativa de PEP en los extractos celulares y de otros procesos paralelos que consuman NADH. La disminución de absorbancia inicial en la reacción del extracto citoplasmático, que proviene del cultivo con 3 μM de insulina, es mayor que en el extracto control y ello sugiere una mayor actividad enzimática en la fracción citoplasmática procedente del cultivo con la hormona. Todas las reacciones enzimáticas presentaron la característica de poseer un aumento de absorbancia a 340 nm en la parte inicial de la cinética, que corresponde a la reacción catalizada por la enzima LDH para formar piruvato y NADH, a expensas de una cierta cantidad de NAD^+ presente en el NADH comercial y del lactato en los extractos celulares y en la preparación comercial de LDH.

Con la finalidad de visualizar el estado de saturación de la enzima en los ensayos, y garantizar que las diferencias de

actividades entre las fracciones dependa sólo de la cantidad de enzima, se determinó la velocidad inicial de la reacción catalizada por la piruvato quinasa en las diferentes fracciones citoplasmáticas procedentes de los cultivos con insulina y del control, utilizando varias cantidades de extracto (3 a 30 mg% de proteínas) y una cantidad fija de sustrato. En la tabla 1 se muestran los valores de las velocidades iniciales de reacción de la piruvato quinasa en la fase logarítmica temprana de crecimiento (pendientes iniciales de las cinéticas de reacción, ver ejemplo de la figura 1A), para las distintas cantidades de los extractos citoplasmáticos (3 a 30 mg% de proteínas) obtenidos de los cultivos celulares con las diferentes concentraciones de insulina (0,3 a 9 μM) y para el control sin la hormona. La insulina ejerce un efecto significativo ($P=0,0001$) sobre la velocidad de reacción dependiente de la concentración de la hormona y del extracto.

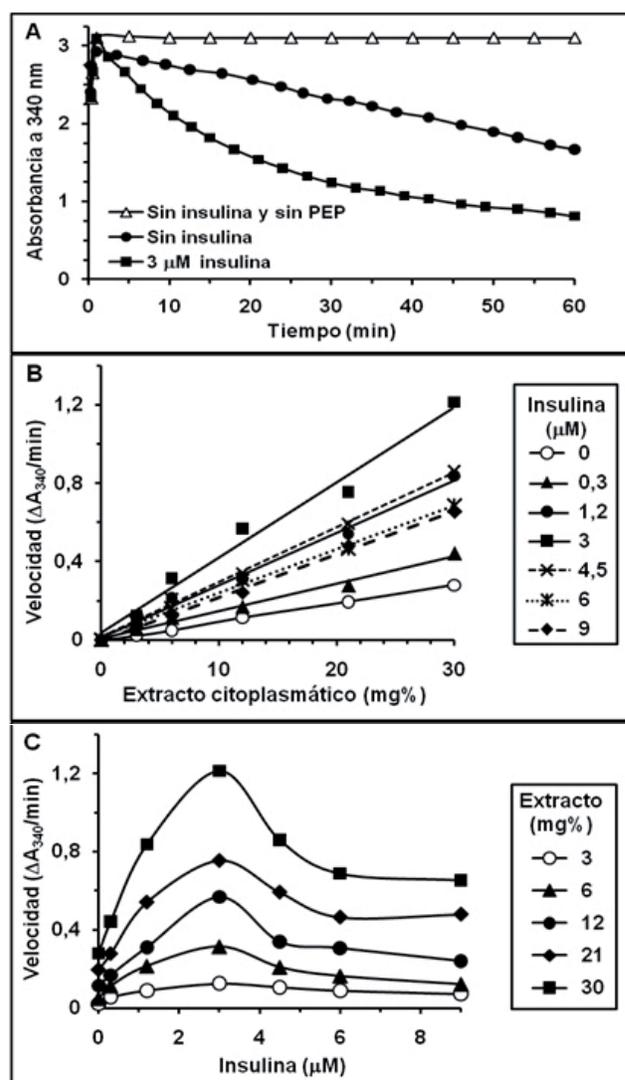


Figura 1. (A) Cinética de reacción de la piruvato quinasa. Se utilizaron 3 mg% de los extractos citoplasmáticos indicados. (B) Velocidades de reacción de la piruvato quinasa en relación a las diferentes cantidades de los extractos celulares obtenidos de los cultivos control y con insulina. (C) Velocidades de reacción enzimática en relación a las distintas concentraciones de insulina en los cultivos y para las diferentes cantidades de los extractos celulares utilizadas en los ensayos. Los datos corresponden a la fase logarítmica temprana de crecimiento. (Ver datos en tabla 1).

Tabla 1. Velocidad inicial de reacción de la piruvato quinasa en la fase logarítmica temprana de crecimiento.

Insulina (μM)	Velocidad de reacción enzimática ($\Delta A_{340}/\text{min}$) $\times 10^{-4}$				
	Extracto citoplasmático (mg% de proteínas)				
	^A 3	^B 6	^C 12	^D 21	^E 30
^F (-)	210 \pm 13	487 \pm 9	1137 \pm 27	1948 \pm 139	2800 \pm 572
^E 0,3	555 \pm 42	1129 \pm 155	1685 \pm 375	2777 \pm 537	4423 \pm 969
^{B,C} 1,2	908 \pm 74	2149 \pm 763	3108 \pm 673	5417 \pm 1396	8374 \pm 967
^A 3,0	1255 \pm 177	3139 \pm 665	5686 \pm 1461	7555 \pm 1542	12141 \pm 1893
^B 4,5	1074 \pm 180	2091 \pm 248	3400 \pm 439	5930 \pm 1814	8608 \pm 1219
^{C,D} 6,0	901 \pm 101	1640 \pm 106	3069 \pm 292	4650 \pm 466	6881 \pm 1106
^D 9,0	728 \pm 108	1223 \pm 501	2410 \pm 135	4797 \pm 547	6539 \pm 1476

Velocidades iniciales de la cinética de reacción con diferentes cantidades (3 a 30 mg% de proteínas) de los extractos citoplasmáticos obtenidos de los cultivos en ausencia o presencia de insulina (0,3 a 9 μM). Cada valor es el promedio de cuatro ensayos independientes y se señala la desviación estándar. $p=0,0001$ dependiente de extracto e insulina. $p=0,0001$ dependiente de insulina. $p=0,0001$ dependiente del extracto. Prueba de Tukey en cada caso: letras iguales implica grupos homogéneos y son significativamente equivalentes.

Con los datos mostrados en la tabla 1, se representan en la figura 1B las velocidades iniciales de la reacción enzimática en relación a las cantidades de extracto procedentes de las células crecidas en ausencia (control) o en presencia de las distintas concentraciones de insulina. La concentración de extracto, de manera independiente a la concentración de insulina, tiene un efecto significativo sobre la velocidad de reacción ($p=0,0001$). En todos los casos se observó una relación lineal de pendiente positiva entre la velocidad de reacción de los extractos procedentes de los cultivos con las diferentes concentraciones de insulina, incluyendo también al control, y la cantidad de proteínas presentes en dicha fracción citoplasmática. Esto indica que la actividad de piruvato quinasa aumenta de manera proporcional al aumento de la cantidad de extracto, y se deduce que hay una saturación inicial de la enzima con el sustrato en todas las mezclas de reacción, por lo tanto, las diferencias de velocidad entre los extractos se deben a las diferencias en la cantidad o actividad de la enzima. La mayor pendiente de las curvas, que indica la mayor actividad de piruvato quinasa, se observó para la concentración de 3 μM de insulina y la menor correspondió al control sin la hormona.

En la figura 1C se representan las velocidades iniciales enzimáticas en relación a las diferentes concentraciones de la hormona en los cultivos y para las distintas cantidades de extracto citoplasmático utilizadas en los ensayos. El efecto de la insulina sobre la velocidad de reacción fue significativo ($p=0,0001$), independientemente de la concentración de extracto utilizada en los ensayos. Para todas las cantidades de extracto se observó un aumento progresivo de la velocidad enzimática inicial a medida que aumentó la concentración de la hormona en las mezclas de reacción, desde 0,3 μM hasta alcanzar un máximo en 3 μM , para disminuir luego hasta un valor casi constante para las concentraciones de 6 y 9 μM , pero que se mantuvo significativamente superior al control (Tabla 1). Las velocidades iniciales de reacción de la enzima en las diferentes fracciones citoplasmáticas fueron determinadas de igual forma en la fase logarítmica tardía de crecimiento (a las 20 horas del cultivo) (datos

no mostrados). En este caso, el efecto de la insulina sobre las velocidades iniciales de reacción dependiente de la concentración de la hormona y del extracto también fue significativo ($p=0,0377$).

Utilizando las velocidades iniciales de reacción y las proteínas totales en los extractos citoplasmáticos en la fase logarítmica temprana y tardía de crecimiento, se determinaron las actividades específicas de la piruvato quinasa en cada extracto citoplasmático procedente del cultivo control y con las diferentes concentraciones de la hormona (Figura 2A). La insulina tuvo un efecto significativo ($p=0$) sobre la actividad específica de la enzima en la fase logarítmica temprana de crecimiento. La actividad específica aumenta progresivamente a medida que aumenta la concentración de insulina, desde un valor de 139 U/mg proteína para el control hasta un máximo de 701 U/mg proteína para 3 μM de la hormona, que representa una estimulación sobre el control de 404%. A partir de 4,5 μM de insulina la actividad disminuye hasta 352 U/mg proteína para 9 μM de la hormona (153% sobre el control). Todos los valores de actividad específica con las diferentes concentraciones de insulina son positivamente significativos respecto al control. Por otra parte, el efecto de la hormona sobre la actividad específica de la enzima en la fase tardía de crecimiento (Figura 2A) también fue significativo ($p=0$), y aunque en general, los valores son mayores que en la fase temprana de crecimiento, los porcentajes de estimulación de la insulina respecto al control son menores. Las concentraciones de 1,2 y 3 μM de insulina ejercieron el mayor efecto estimulador con valores de 677 y 733 U/mg de proteína (equivalentes significativamente), que representan un porcentaje sobre el control de 40 y 51% respectivamente. Para 0,3; 4,5 y 6 μM de la hormona, la estimulación también fue significativa respecto al control (23, 18 y 19% respectivamente).

El patrón de estimulación de la insulina sobre la actividad absoluta de la piruvato quinasa en la fase logarítmica temprana fue similar al observado con la actividad específica y también fue significativo ($p=0$) (Figura 2B). La mayor actividad absoluta se obtuvo para una concentración

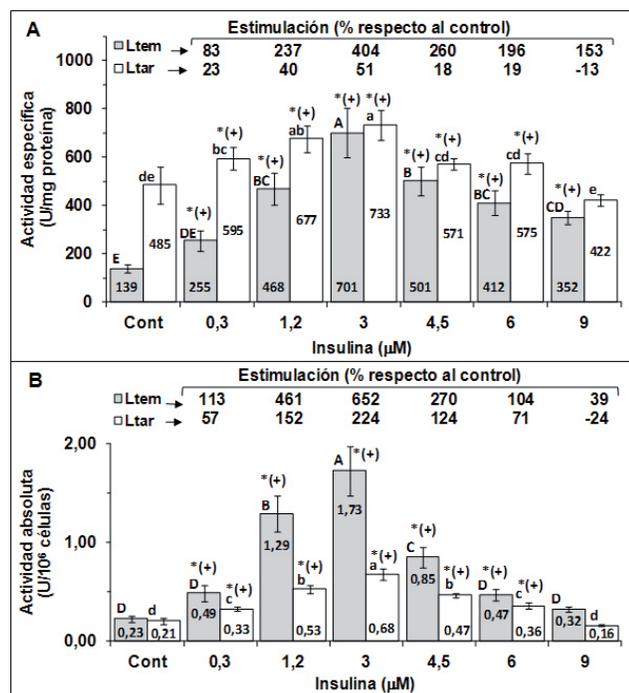


Figura 2. Actividades específicas (A) y actividades absolutas (B) de la piruvato quinasa en los extractos citoplasmáticos de los cultivos sin insulina (Cont) y con las concentraciones indicadas de la hormona. Los datos corresponden a la fase logarítmica temprana (Ltem) y logarítmica tardía (Ltar) de crecimiento y son el promedio de cuatro ensayos independientes. Se indican los porcentajes de estimulación respecto al control. (A) Ltem: $p=0$ y Ltar: $p=0$ dependiente de insulina. (B) Ltem: $p=0$ y Ltar: $p=0$ dependiente de insulina. (A) y (B): Ltem o Ltar: Prueba de Tukey; letras iguales significa grupos homogéneos. Prueba de múltiples comparaciones con el control de Dunnett: *(+): positivamente significativo respecto al control.

de 3 μM de insulina, con un valor de 1,73 U/10⁶ células y una estimulación respecto al control de 652%. En la etapa logarítmica tardía de crecimiento, la actividad absoluta disminuye en relación a la observada en la fase temprana en las fracciones procedentes de los cultivos con insulina (Figura 2B). A pesar de la disminución de la actividad, el efecto estimulador de la hormona en la fase logarítmica tardía siguió siendo significativo ($p=0$) y el mayor efecto continuó observándose a 3 μM de insulina con una actividad de 0,68 U/10⁶ células, que representa una estimulación sobre el control de 224%.

Efecto de la insulina sobre la expresión de proteínas citoplasmáticas: En la etapa logarítmica temprana de crecimiento la insulina tuvo un efecto altamente significativo ($p=0$) sobre la cantidad de proteínas en el extracto citoplasmático por célula (Figura 3A). Las concentraciones de la hormona correspondientes a 1,2 y 3 μM ejercieron el mayor efecto y con valores de 2,76 y 2,48 pg de proteínas/célula (significativamente equivalentes), que representan el 68 y 51% de estimulación sobre el control respectivamente. Las concentraciones más altas de la hormona (6 y 9 μM) produjeron una disminución de las proteínas por célula equivalentes significativamente respecto al control (-30% y -44%).

En la fase logarítmica tardía de crecimiento se observó una disminución en la cantidad de proteínas en relación a la fase temprana (Figura 3A). Sin embargo, el efecto estimulador de la hormona siguió siendo muy significativo ($p=0$). Las concentraciones de 1,2; 3 y 4,5 μM de insulina presentaron el mayor incremento sobre el control: 84%, 116%, 91%, respectivamente.

Efecto de la insulina sobre el crecimiento celular: La insulina ejerció un efecto significativo sobre la proliferación celular de la levadura ($p=0,0022$) en la fase logarítmica temprana de crecimiento (Figura 3B). Las concentraciones de 4,5; 6 y 9 μM de la hormona tuvieron el mayor efecto sobre el control con estimulaciones de 25%, 29% y 32% respectivamente (equivalentes significativamente). El efecto de la insulina sobre el crecimiento celular, en la fase tardía de crecimiento (Figura 3B), no fue significativo respecto al control ($p=0,6030$), aunque se observó una tendencia estimuladora semejante a la detectada en la fase temprana de crecimiento. Esto sugiere la finalización de la acción de la hormona sobre la división celular, y por lo tanto, el número de células del control se acerca a los valores alcanzados en los cultivos con insulina.

Análisis de la variación de los efectos de la insulina sobre la actividad de piruvato quinasa y las proteínas citoplasmáticas durante las etapas de crecimiento: La variación del efecto de la insulina sobre las proteínas y la actividad enzimática durante el crecimiento de *S. cerevisiae* se muestra en la tabla 2. Se observa que la cantidad de picogramos de proteínas por célula disminuyó significativamente en la fase tardía del crecimiento en todos los casos, siendo esta disminución mayor para las fracciones correspondientes al control y a las concentraciones más bajas de insulina en los cultivos (0,3; 1,2 y 3 μM). La actividad específica aumentó de manera general en la fase tardía de crecimiento, pero permaneció casi constante para las concentraciones de insulina (3 y 4,5 μM), donde se detectó la mayor estimulación respecto al control en la fase temprana (Figura 2A). El aumento de la actividad específica de los extractos se debió en cierta medida a la disminución de las proteínas totales citoplasmáticas en esta etapa del crecimiento (ver figura 2A y relaciones de las proteínas citoplasmáticas en la tabla 2), que ocasionó una mayor proporción de la piruvato quinasa por miligramo de proteína. Al mismo tiempo, esta observación indica que la insulina tiene mayor especificidad para estimular la expresión genética de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos en este microorganismo. Por otra parte, la disminución de las proteínas citoplasmáticas en la fase logarítmica tardía de crecimiento fue mayor para el control (3,81 veces) que para las fracciones de los cultivos con insulina, indicando que la hormona contribuye a disminuir la pérdida de la masa celular en esta etapa del crecimiento. Las relaciones de actividad absoluta muestran que la disminución de esta actividad en la fase tardía fue significativa para las concentraciones de 1,2; 3 y 4,5 μM de la hormona y corresponden a las fracciones con insulina que

tuvieron la mayor actividad absoluta en la fase temprana de crecimiento (Figura 2B), sugiriendo un proceso de regulación sobre la acción de la hormona en este sistema de levadura.

Discusión

Los resultados de este estudio demostraron que la insulina humana estimula la actividad de la enzima piruvato quinasa, la expresión de proteínas citoplasmáticas y la proliferación celular de *S. cerevisiae* durante su crecimiento en condiciones aeróbicas, en un medio rico en nutrientes y en presencia de glucosa. Esto indica que probablemente la hormona tiene un efecto global sobre el metabolismo, crecimiento y masa celular de la levadura.

El mayor efecto de la insulina sobre la actividad de la piruvato quinasa se observó en la fase logarítmica temprana de crecimiento y en un rango de concentración de la hormona entre 1,2-4,5 μM con un máximo en 3 μM (~652% sobre el control para la actividad absoluta) (Figura 2B). No hay datos en la literatura sobre el efecto de la insulina en la enzima piruvato quinasa de levadura, sin embargo, se han obtenido resultados similares en varias investigaciones sobre su efecto en otras enzimas relacionadas con el metabolismo de la glucosa y la incorporación de este carbohidrato al interior celular [11,14]. Por analogía con otras investigaciones, el efecto de la insulina sobre la piruvato quinasa debe ocurrir por la vía del receptor específico en la membrana plasmática de la levadura y el desarrollo posterior de una serie de reacciones a través de las rutas de señalización, que culminan con la estimulación de la actividad enzimática. En la membrana plasmática de *S. cerevisiae* se ha identificado un complejo proteico que tiene afinidad de enlace por la insulina humana y su fosforilación en residuos de serina y tirosina es estimulada por la hormona [15], un mecanismo muy semejante a la autofosforilación del receptor de insulina de mamíferos después de enlazar a su ligando [1,2]. Por otra parte, se ha demostrado que la interacción de la hormona con el receptor de levadura guarda perfecta correlación con las actividades de enzimas que intervienen en el metabolismo del glucógeno [16,17].

La investigación del mecanismo por el cual la insulina estimula la actividad de piruvato quinasa en *S. cerevisiae* se transforma en un punto interesante a considerar. El efecto de la hormona podría ser consecuencia de una estimulación en cualquier paso de la expresión genética de la enzima, incluyendo un efecto metabólico sobre sus efectores y reguladores, como por ejemplo, las fosfatasa y quinasas específicas que podrían controlar su actividad, posiblemente por mecanismos similares a los de mamíferos. La insulina en presencia de nutrientes estimula la transcripción del ARNm de la piruvato quinasa por un mecanismo no bien establecido, que involucra el aumento de la expresión y activación del factor transcripcional SREBP-1c por la vía mTORC1 [5,9]. En levaduras también se ha descrito que el complejo TOR juega un papel crucial en la respuesta a nutrientes, al igual que en mamíferos [22]. Por otra parte, a

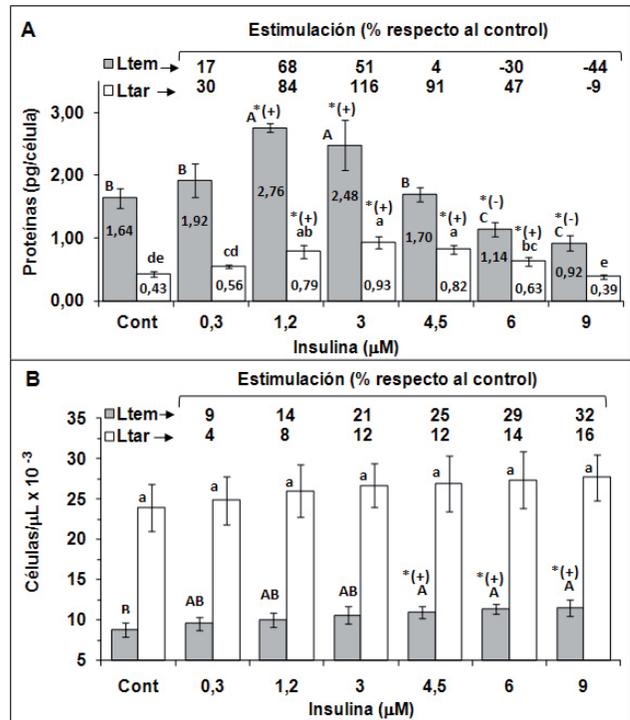


Figura 3. Efecto de la insulina sobre la expresión de proteínas citoplasmáticas (A) y sobre el crecimiento celular (B). Los datos corresponden a la fase logarítmica temprana (Ltem) y la fase logarítmica tardía de crecimiento (Ltar), y son el promedio de cuatro ensayos por separado. Se indican los porcentajes de estimulación (A) Ltem: p=0 y Ltar: p=0 dependiente de insulina. (B) Ltem: p=0,0022 y Ltar: p=0,6030 dependiente de insulina. (A) y (B): Ltem o Ltar: Prueba de Tukey; letras iguales significa grupos homogéneos. Prueba de múltiples comparaciones con el control de Dunnett: *(+): positivamente significativo. *(-): negativamente significativo.

concentraciones bajas de glucosa y altos niveles de cAMP, la actividad de piruvato quinasa disminuye por acción de la proteína quinasa A (PKA) y la insulina provoca el efecto inverso, actuando sobre la fosfatasa 2A (PP2A) a concentraciones altas del carbohidrato [8]. En *S. cerevisiae* también podría operar un mecanismo similar, ya que se ha reportado que bajo ciertas condiciones de crecimiento, la insulina de mamíferos estimula a la fosfatasa 2A, a la fofosdiesterasa-cAMP, y disminuye la actividad de la PKA [17].

La estimulación de la insulina sobre la actividad absoluta de la piruvato quinasa disminuyó en la fase logarítmica tardía (~224% sobre el control para la actividad absoluta a 3 μM de insulina) (Figura 2B y Tabla 2), indicando que la hormona tiene un tiempo de acción. En otro trabajo realizado con células de *S. cerevisiae* envejecidas, también se observó la disminución del efecto de la insulina sobre la actividad de las enzimas implicadas en la regulación del glucógeno [13]. Algunas investigaciones han mostrado que la insulina plasmática y la actividad de la piruvato quinasa disminuyen con el tiempo después de ingerir una dieta rica en carbohidratos, sugiriendo que las condiciones nutricionales del entorno influyen en la actividad hormonal y enzimática [23]. En este trabajo, cuando los cultivos se acercan a la fase estacionaria, el agotamiento de nutrientes puede provocar que se activen respuestas semejantes a

Tabla 2. Variación de los efectos de la insulina sobre la actividad de piruvato quinasa y las proteínas citoplasmáticas durante las etapas de crecimiento.

Insulina (μM)	Relación entre las fases logarítmicas de crecimiento		
	Proteínas (pg/célula) (temprana/tardía)	Piruvato quinasa Actividad específica (temprana/tardía)	Piruvato quinasa Actividad absoluta (temprana/tardía)
-	*3,81 \pm 0,04	*0,29 \pm 0,01	1,09 \pm 0,05
0,3	*3,44 \pm 0,33	*0,43 \pm 0,04	1,47 \pm 0,16
1,2	*3,50 \pm 0,40	*0,69 \pm 0,04	*2,43 \pm 0,14
3,0	*2,66 \pm 0,17	0,95 \pm 0,06	*2,55 \pm 0,19
4,5	*2,07 \pm 0,05	0,88 \pm 0,07	*1,82 \pm 0,13
6,0	*1,81 \pm 0,02	*0,71 \pm 0,04	1,30 \pm 0,06
9,0	*2,37 \pm 0,08	0,83 \pm 0,02	1,96 \pm 0,34

* Diferencias significativas entre las fases según la prueba de contrastes ortogonales de Scheffé's ($0 \leq p \leq 0,0064$).

las que se originan en condiciones de estrés y se inhiba la acción de la hormona por mecanismos similares a los que ocurren en mamíferos, disminuyendo su efecto sobre la piruvato quinasa. En mamíferos, en condiciones de bajo estatus energético y escasez de nutrientes, se inhibe la vía mTORC1 en la ruta metabólica de la insulina por acción de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) controlada por la hormona, disminuyendo la sensibilidad a la insulina por la vía PI3K-IRS-1 y en general la traducción y la transcripción de una cantidad de genes regulados por la insulina, entre ellos, los relacionados con enzimas del metabolismo de la glucosa [24,4]. El mecanismo TOR-nutrientes es muy conservado en la escala evolutiva [25] y la levadura en presencia de insulina podría activar un mecanismo similar a través de la quinasa Snf1, equivalente funcionalmente a la MAPK de mamíferos. Esta observación guarda relación con otros trabajos donde se determinó que la actividad de Snf1 en *S. cerevisiae* estaba perfectamente correlacionada con el enlace de la insulina al receptor en la membrana plasmática [14,16], sugiriendo que ambas quinasas (Snf1 y AMPK) pueden tener acciones similares en presencia de la hormona.

Los resultados también mostraron que la insulina tiene un efecto estimulador en la expresión de proteínas citoplasmáticas, de menor magnitud que el observado con la piruvato quinasa, pero significativo: 68% y 51% sobre el control para 1,2 y 3 μM respectivamente en la etapa logarítmica temprana de crecimiento (Figura 3A). Se deduce entonces que la hormona tiene un efecto global sobre el aumento de la masa celular, que podría explicarse por una estimulación a nivel transcripcional de genes específicos y por una estimulación a nivel traduccional de una subpoblación de ARNm. Dicha conclusión podría tener relación con otro trabajo realizado en *S. cerevisiae*, donde se encontró que la adición de insulina en presencia de glucosa provocaba cambios morfológicos en las células, detectándose formas redondeadas y de mayor tamaño en comparación con las formas alargadas sin la hormona [12]. Igualmente, algunas investigaciones en *Drosophila melanogaster* han detectado que la ruta metabólica de la insulina o vía de la PI3K-

Akt/PKB juega un papel importante en la regulación del crecimiento celular y de la masa y medida celular [26,27]; además, el complejo proteico mTOR bajo condiciones nutricionales adecuadas, estimula la hipertrofia celular por un aumento en la cantidad de proteínas y ARN [4].

En la fase logarítmica tardía, la cantidad de proteínas citoplasmáticas por célula fue menor en relación a la fase temprana en todos los casos, posiblemente por la activación de las respuestas al estrés mencionadas anteriormente debido a la disminución de nutrientes (Figura 3A y Tabla 2). También se observó que la disminución de proteínas fue mucho mayor en el control sin insulina (Tabla 2), causando que la estimulación por la hormona fuera más notoria que en la fase temprana de crecimiento (incremento de 117% sobre el control para 3 μM de insulina) (Figura 3A). Esto a su vez sugiere que en presencia de la hormona las células tienen la tendencia a perder menos masa a medida que se acercan a la fase estacionaria.

Los resultados también mostraron una estimulación de la hormona sobre el crecimiento celular (Figura 3B). En algunos trabajos se ha determinado el efecto de la insulina humana en la proliferación de *S. cerevisiae* y la estimulación encontrada depende del medio utilizado [11,12,28]. En este trabajo es interesante observar que el mayor estímulo en el crecimiento celular (25 a 32%) (Figura 3B) fue detectado en la etapa logarítmica temprana y con las concentraciones más altas de la hormona en los medios de cultivo (~4,5 a 9 μM). Sin embargo, el mayor efecto estimulador sobre la actividad de la piruvato quinasa (Figura 2) y de las proteínas citoplasmáticas (Figura 3A), se detectó a concentraciones menores de la hormona (~1,2 y 3 μM). Esto sugiere que una concentración alta de insulina en el medio de cultivo ejerce principalmente un efecto mitogénico sobre las células, mientras que una concentración menor actúa de manera preferencial sobre la actividad metabólica. Por lo tanto, se infiere que bajo ciertas condiciones las rutas de señalización pueden actuar de manera independiente, y la mayor o menor activación de una respecto a la otra dependen al menos de la concentración de la hormona. Al igual que los resultados en este trabajo, algunos experimentos en *Drosophila* han

mostrado que las células con mayor actividad mitogénica tienen la tendencia a poseer menor masa y medida. Los datos indicaron que los procesos que controlan la división celular y la masa celular podían activarse de manera independiente [29]. También se demostró que el aumento de actividad en la vía insulina/PI3K estimuló la cantidad de masa celular sin tener un efecto pronunciado en la división celular [26,27]. Otra posibilidad sobre el efecto mitogénico de la insulina a altas concentraciones podría ser su interacción con receptores celulares de factores de crecimiento en la membrana plasmática de la levadura, aumentando así el efecto sobre la proliferación celular. Este hecho sería similar al que ocurre en mamíferos en condiciones de hiperinsulinemia [30,31].

El sistema de levadura descrito en este trabajo puede servir como modelo para estudiar los efectos moleculares de la insulina en la expresión genética de enzimas claves en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Los análisis contribuirían a detectar genes controlados por la hormona en mamíferos involucrados en desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y mal de Alzheimer. Este tipo de investigación también sería importante para analizar los mecanismos de señalización celular entre microorganismo-huésped. En el caso específico de la insulina el intercambio puede activar genes virulentos en dichos microorganismos volviéndolos patógenos [32]. Por consiguiente, conocer los mecanismos de señalización permitiría diseñar estrategias para minimizar los efectos negativos.

Agradecimientos

A la Lic. Ninoska Ramírez y al Técnico Antonio Yépez por la excelente asistencia técnica. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC: Programa para tesis de Pregrado; Proyecto Mayor CDCH-98-003) y por el Proyecto del FONACIT para el Fortalecimiento del Lab. de Síntesis de Proteínas y Ácidos Nucleicos del BIOMED-UC. Algunos de los datos experimentales forman parte de la tesis para la Licenciatura en Bioanálisis de Gilbert González y Gabriela Lozano.

Referencias

- Kim SK, Novak RF. The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol Ther.* 2007; 113:88-120.
- Choi KD, Kim YB. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med.* 2010; 25:119-29.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 2001; 15:807-26.
- Yang X, Yang C, Farberman A, Rideout TC, de Lange CF, France J, Fan MZ. The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. *J Anim Sci.* 2008; 86:E36-E50.
- Laplante M, Sabatini DM. mTORC1 activates SREBP-1c and uncouples lipogenesis from gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:3281-2.
- Zhao L, Teter B, Morihara T, Lim GP, Ambegaokar SS, Ubeda OJ, Frautschy SA, Cole GM. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention. *J Neurosci.* 2004; 24:11120-6.
- Furukawa Y, Shimada T, Furuta H, Matsuno S, Kusuyama A, Doi A, et al. Polymorphisms in the IDE-KIF11-HHEX gene locus are reproducibly associated with type 2 diabetes in a Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:310-4.
- Yamada K, Noguchi T. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J.* 1999; 337:1-11.
- Foufelle F, Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J.* 2002; 366:377-91.
- Denechaud PD, Bossard P, Lobaccaro JM, Millatt L, Staels B, Girard J, Postic C. ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest.* 2008; 118:956-64.
- Mirsky N, Berdicevsky I. Effects of insulin and glucose tolerance factor on glucose uptake by yeast cells. *Biol Signals.* 1994; 3:271-7.
- Berdicevsky I, Mirsky N. Effects of insulin and glucose tolerance factor (GTF) on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycoses.* 1994; 37:405-10.
- Lodolo EJ, O'Connor-Cox ESC, Axcell, BC. Novel application of glucagon and insulin to alter yeast glycogen concentrations. *J Am Soc Brew Chem.* 1995; 53:145-51.
- Müller G, Rouveyre N, Creelius A, Bandlow W. Insulin signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Stimulation of glucose metabolism and Snf1 kinase by human insulin. *Biochemistry.* 1998; 37:8683-95.
- Müller G, Rouveyre N, Upshon C, Bandlow W. Insulin signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Induction of protein phosphorylation by human insulin. *Biochemistry.* 1998; 37:8705-13.
- Müller G, Rouveyre N, Upshon C, Grobota E, Bandlow W. Insulin signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Interaction of human insulin with a putative binding protein. *Biochemistry.* 1998; 37:8696-704.
- Müller G, Grey S, Jung C, Bandlow W. Insulin-like signaling in yeast: modulation of protein phosphatase 2A, protein kinase A, cAMP-specific phosphodiesterase, and glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities. *Biochemistry.* 2000; 39:1475-88.
- Wang H, Chu W, Das SK, Ren Q, Hasstedt SJ, Elbein SC. Liver pyruvate kinase polymorphisms are associated with type 2 diabetes in Northern European Caucasians. *Diabetes.* 2002; 51:2861-5.
- Plotkin BJ, Viselle SM. Effect of insulin on microbial growth. *Curr Microbiol.* 2000; 41:60-4.
- Peterson, GL. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem.* 1979; 100:201-20.
- Malcovati M, Valentini G. AMP-and fructose 1, 6-Biphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Meth Enzymologist.* 1982; 90:170-9.
- Nakashima A, Sato T, Tamanoi F. Fission yeast TORC1

- regulates phosphorylation of ribosomal S6 proteins in response to nutrients and its activity is inhibited by rapamycin. *J Cell Sci.* 2010; 123:777-86.
23. Enes P, Sanchez-Gurmaches J, Navarro I, Gutiérrez J, Oliva-Teles A. Role of insulin and IGF-I on the regulation of glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed with different dietary carbohydrate levels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2010; 157:346-53.
 24. Lim CT, Kola B, Korbonits M. AMPK as a mediator of hormonal signaling. *J Mol Endocrinol.* 2010; 44:87-97.
 25. Fuchs BB, Mylonakis E. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot Cell.* 2009; 8:1616-25.
 26. Verdu J, Buratovich MA, Wilder EL, Birnbaum MJ. Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB. *Nat Cell Biol.* 1999; 1:500-6.
 27. Weinkove D, Neufeld TP, Twardzik T, Waterfield MD, Leever SJ. Regulation of imaginal disc cell size, cell number and organ size by *Drosophila* class I(A) phosphoinositide 3-kinase and its adaptor. *Curr Biol.* 1999; 9:1019-29.
 28. Overgaard AK, Kierklo L, Christiansen H, Chrois P, Rasmussen L, Friis J. Resumption of rapid proliferation from lag phase in cultures of *Saccharomyces cerevisiae* in poor nutrient conditions. Effect of surface and intracellular signalling mechanisms. *Cell Biol Int.* 1998; 22:709-14.
 29. Coelho CM, Leever SJ. Do growth cell division rates determine cell size in multicellular organisms? *J Cell Sci.* 2000; 113:2927-34.
 30. King GL, Goodman AD, Buzney S, Moses A, Kahn CR. Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulin-like growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta. *J Clin Invest.* 1985; 75:1028-36.
 31. Arnqvist HJ. The role of IGF-system in vascular insulin resistance. *Horm Metab Res.* 2008; 40:588-92.
 32. Hughes DT, Sperandio V. Inter-kingdom signaling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6:111-20.