

# Rutas de señalización de la insulina en plantas

*Aurelio Juárez Domínguez, Grisel Fierros Romero, Ma. Elena Mellado-Rojas, Homero Reyes de la Cruz, Ernesto García Pineda y Elda María Beltrán-Peña*

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

## RESUMEN

Desde el descubrimiento de la insulina pancreática por Banting *et al.*(1), esta hormona ha sido objeto de numerosas investigaciones, ya que además de su papel en el metabolismo de la glucosa, también participa en algunos procesos del crecimiento. Varios de los componentes de la ruta de señalización inducidos por la insulina en mamíferos, también han sido reportados en plantas. En la presente revisión presentamos la información desde el descubrimiento de la insulina en mamíferos hasta las investigaciones en plantas que sugieren la presencia de péptidos similares a insulina, así como su efecto sobre el crecimiento vegetal. Además, se discuten aspectos sobre la tecnología para la producción de la insulina recombinante en plantas.

**Palabras clave:** Insulina, crecimiento, péptidos similares a insulina.

## ABSTRACT

Since the discovery of pancreatic insulin by Banting *et al.*(1), this hormone has been the subject of many investigations because its classical role in glucose metabolism and in growth processes. Several components of the insulin signaling pathway in mammals have been reported in plants. In this review, we present information from insulin research in mammals and evidence that suggests the presence of insulin-like peptides in plants and their effect on growth. Moreover, we discuss aspects about the technology for the production of recombinant insulin in plants.

**Keywords:** Insulin, growth, insulin-like peptides.

## INTRODUCCIÓN

La insulina es una hormona proteica segregada por el páncreas en respuesta a niveles elevados de glucosa en la sangre. Cuando esta hormona se libera, la proteína se une a su receptor el cual se encuentra localizado en la superficie celular de hepatocitos, adipocitos y células musculares. La insulina está involucrada principalmente en la regulación del metabolismo energético, pero también ha mostrado efectos mitogénicos (2). Por otro lado, la insulina y algunos factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) en mamíferos, son hasta ahora los efectores mejor caracterizados que participan en la regulación de la síntesis de proteínas a través de mecanismos de transducción de señales involucrados en el crecimiento celular (3). En plantas, se ha reportado que algunos de los componentes de la ruta de señalización descrita en mamíferos son inducidos por la insulina. En la presente revisión discutiremos la historia de la insulina y sus efectos en mamíferos y en plantas.

## 1. DESCUBRIMIENTO DE LA INSULINA

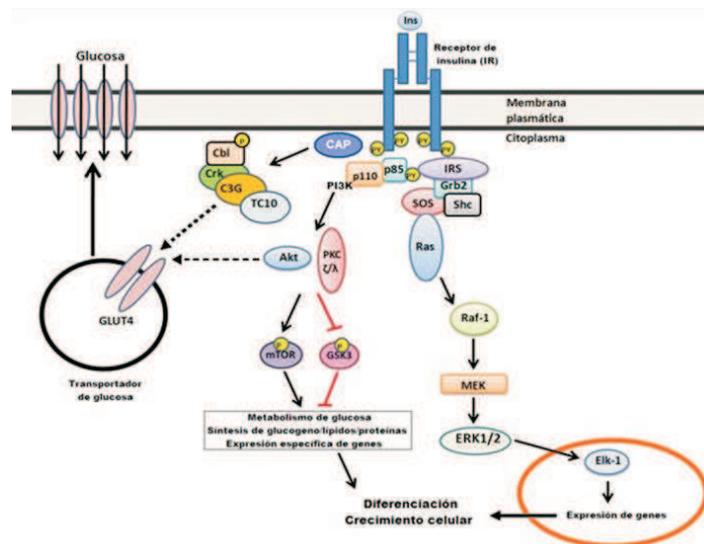
En 1922, Frederick Grant Banting y Charles Herbert Best publicaron en el *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* y en el *Canadian Medicine Association Journal* sus investigaciones sobre el efecto de la secreción pancreática y el extracto pancreático en el tratamiento de la *diabetes mellitus*, basadas en la doble hipótesis de que el tejido insular secretaba insulina y que la dificultad de su aislamiento se debía a la destrucción por las enzimas proteolíticas del páncreas. Con la aplicación de técnicas de extracción con alcohol acidificado, estos investigadores logran aislar la insulina y analizan sus efectos en el paciente Leonardo Thomson de 14 años de edad, quien ingresa al Hospital General de Toronto Canadá con una glucemia de 500 mg/ml y mediante una aplicación diaria de insulina logra salvar su vida (4). En 1926 John Abel purifica y cristaliza la insulina. A partir de su descubrimiento, este compuesto fue prescrito universalmente para el tratamiento de la diabetes y siempre en la búsqueda de mejorar tanto aspectos fisiológicos, farmacológicos y económicos de los pacientes, la historia de la insulina continúa escribiéndose (5).

## 2. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN EN MAMÍFEROS REGULADAS POR LA INSULINA

La acción de la insulina está mediada por su unión al receptor IR (del inglés *Insulin Receptor*), el cual se autofosforila, permitiendo la activación de su dominio tirosina cinasa (6). Entre los blancos de la cinasa IR, se han identificado proteínas como la proteína adaptadora (Shc), los sustratos del receptor de insulina (IRS) y la proteína 1 asociada a GRB 2 (Gab-1) entre otros, los cuales se encargan de transmitir la señal del receptor hacia el citosol (7).

El receptor IR activa tres cascadas de señalización principales: 1) La fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) conocida también como ruta metabólica, 2) proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), denominada cascada mitogénica y 3) la ruta Cbl/CAP que permite la

entrada de glucosa a la célula (Fig. 1). Como mencionamos anteriormente, la respuesta metabólica a la insulina está mediada principalmente por la vía PI3K, que inicia con la asociación de la cinasa PI3K al sustrato del receptor de insulina (IRS). La PI3K al ser activada fosforila al fosfatidil inositol 4,5 difosfato (PIP2), un lípido de membrana, estimulando la producción del PIP3, el cual en altas concentraciones actúa como segundo mensajero al dar la señal para que se recluten hacia la membrana plasmática las proteínas cinasas: proteína cinasa 1 dependiente de 3 fosfoinositol (PDK1) (8, 9), y Akt también denominada PKB (proteína cinasa B) a través de su dominio PH (homología "pleckstrin") (10). Posteriormente, Akt fosforila en múltiples sitios a la proteína 2 del complejo de esclerosis tuberosa (TSC2) que muestra una actividad de proteína activadora de GTPasa (GAP) sobre Rheb, una GTPasa pequeña homóloga de Ras enriquecida en cerebro, convirtiéndola de su forma activa unida a GTP a la inactiva unida a GDP. La forma activa de RHEB estimula la actividad de fosfo-transferasa del complejo mTORC1, lo que permite la fosforilación de sus blancos: la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K) y la proteína de unión al factor de inicio de la traducción eIF4E (4EBP) (11). La cinasa S6K fosforila a la proteína ribosomal S6 de la subunidad pequeña del ribosoma; los ribosomas fosforilados en S6 reclutan transcritos que presentan tramos de polipirimidinas en el extremo 5' terminal. Interessantemente, estos mRNAs codifican para proteínas ribosomales y factores de elongación (Fig. 1) (12).



**Figura 1. Cascada de transducción de señales de la insulina.** El receptor de insulina es una tirosina cinasa que al autofosforilarse cataliza la fosforilación de proteínas celulares como IRS y Cbl, permitiendo así que interactúen con otras moléculas de señalización, activando con ello diversas respuestas celulares. Dichas cascadas incluyen la activación de la PI3K, de las MAPK y del complejo Cbl/CAP. Las cascadas antes mencionadas actúan de manera concertada para coordinar la regulación del tráfico de vesículas, síntesis de proteínas, activación e inactivación de enzimas y expresión de genes dando como resultado la regulación del metabolismo de glucosa, lípidos y proteínas. Modificado de (10, 11).

Por otra parte, la ruta de las MAPK se activa cuando la proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2) se une a Shc y al IRS. A su vez, Grb2 se encuentra ligada a una proteína de intercambio de nucleótidos denominada Son, *Sevenless* o mSOS en mamíferos, esta última cataliza el intercambio de GDP por GTP de una pequeña proteína con actividad de GTPasa denominada Ras, resultando en su activación. Ras entonces, se une a la membrana plasmática, donde recluta a Raf. La interacción Ras-Raf desplaza las proteínas que están ligadas a Raf permitiendo la fosforilación de Raf por cinasas Ser/Tr, liberando de esta manera a la cinasa Raf, la cual entonces fosforila a MEK1 (13). Esta última, activa a otras dos cinasas denominadas ERK-1 y ERK-2, que son mediadoras de los efectos mitogénicos y anabólicos de la insulina, induciendo la fosforilación de factores de transcripción y con ello la expresión genética que da lugar a la proliferación y diferenciación celular (14). El bloqueo de la vía MAPK por mutantes o inhibidores farmacológicos impide y previene la estimulación del crecimiento y diferenciación celular inducida por la insulina, pero no tiene ningún efecto en las acciones metabólicas de la hormona.

### 3. DIABETES Y RESISTENCIA A INSULINA

La diabetes es un desorden metabólico en donde el cuerpo humano no produce o usa apropiadamente la insulina y se caracteriza por la presencia de niveles altos de glucosa en la sangre. Un mecanismo fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa es su captación y metabolismo en los tejidos periféricos, adiposo y muscular, estimulados por la insulina. El músculo esquelético es el primer sitio de captación de glucosa. Existen dos tipos de diabetes mellitus: la tipo 1, causada por la destrucción de las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas que se presenta generalmente por un desorden autoinmune mediado por las células T, la ocurrencia mayoritaria de la diabetes tipo 1 es en niños por lo que se conoce también como diabetes juvenil (15). La diabetes mellitus tipo 2, independiente de insulina, es la forma más común de esta enfermedad en el mundo. La diabetes, resulta de interacciones complejas de factores hereditarios y del medio ambiente (16) como la obesidad, dietas pobres, estrés elevado, estilo de vida sedentario, drogas, infecciones, hipertensión y altos niveles de lipoproteínas (17). La resistencia a la acción de la insulina en el músculo esquelético es el factor patogénico principal que se presenta en los dos tipos de diabetes y también contribuye a la morbilidad de la obesidad y complica el tratamiento para la diabetes tipo 1. La actividad de la insulina para incrementar el transporte de glucosa en el músculo esquelético se debe a la translocación del transportador de glucosa 4 (Glut 4) (18). La resistencia a insulina se presenta cuando produce una respuesta biológica menor a la normal y es considerada como un componente importante en la diabetes tipo 2 (19). Dicha resistencia se caracteriza por defectos a varios niveles de la cascada, como la disminución en la expresión de los receptores y en su actividad de cinasa, en la concentración y fosforilación de los IRS 1 y 2, en la actividad de PI3K, en la translocación del transportador de glucosa, así como también en la actividad de enzimas intracelulares. Defectos genéticos en el receptor son poco frecuentes pero representan la forma más severa de resistencia a insulina (10). La resistencia a la estimulación por insulina puede ser causada por alteraciones en la

ruta de transducción de señales. La actividad de la PI3K inducida por la insulina disminuye en el músculo esquelético de sujetos con diabetes tipo 2, lo que proporciona evidencias de que un defecto en la señalización de insulina podría contribuir al daño en la translocación de Glut4 y por lo tanto a la resistencia a insulina (18).

#### 4. PRESENCIA DE INSULINA EN PLANTAS

La insulina es una hormona secretada por el páncreas en animales, cuya función principal es regular los niveles glucosa en la sangre. Sin embargo, desde los primeros estudios de la insulina reportados en animales, existen evidencias en la literatura que muestran la presencia de sustancias similares a dicha hormona en varias especies vegetales como cebolla y remolacha entre otras, a la que denominaron "glucocinina" para diferenciarla de la insulina (20). De igual manera, Best y Scoot (1923), reportaron sustancias parecidas a insulina en germinados de papa y arroz; ese mismo año Ellis y Eyster (21) mostraron resultados cualitativos de la acción de insulina y glucocinina en la germinación del maíz, pero fue hasta 1970 cuando se reportó la presencia de insulina en plantas y se patentó un proceso para su obtención a partir de frutos de *Momordica charantia* (melón amargo). Los productos aislados del melón amargo se denominaron v-insulina, polipéptido-p o p-insulina, los cuales mostraron actividad hipoglucémica, pero no presentaron reacción con el anticuerpo contra insulina bovina y su composición de aminoácidos fue diferente a la hormona animal (22). Trabajos posteriores reportaron un péptido parecido a insulina, aislado de las semillas de *M. charantia*, empleando el mismo método de etanol ácido reportado por Best y Scoot, (1923) para extraer insulina de varios tejidos (23). Con un esquema de purificación que incluía filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico, se obtuvieron varias fracciones con propiedades similares a la insulina de animales (24). A principios de los 90's se reportó que la adición de insulina y factores de crecimiento parecidos a insulina (IGF-I, IGF-II) aceleraban el desarrollo post-germinativo de semillas como girasol, melón y pepino (25). Experimentos de inmunodetección con el anticuerpo de insulina bovina, evidenciaron la presencia de péptidos similares a insulina en zanahoria y frijol (26). Posteriormente, se reportó el efecto de la insulina en la síntesis de proteínas ribosomales de ejes embrionarios de maíz (27). Rodríguez-López y colaboradores (2011) caracterizaron un factor de crecimiento en maíz, similar a la insulina, al cual denominaron ZmIGF (*Zea mays insulin-like growth factor* por sus siglas en inglés) que presentó un peso de 5.7 kDa y fue aislado de ejes embrionarios de semillas de maíz con 48 h de germinación o de callos embriogénicos. Los autores observaron que tejidos de maíz estimulados con ZmIGF o con insulina inducían la síntesis selectiva de las proteínas ribosomales y de ADN. En conjunto, los datos antes mencionados sugieren que las plantas contienen una hormona peptídica de la familia IGF, altamente conservada que regula el crecimiento y el desarrollo (28). A partir de estudios *in silico* se ha establecido que moléculas parecidas a insulina existen en el reino vegetal (29).

## 5. COMPONENTES DE LA CASCADA PI3K EN PLANTAS

Varias proteínas como son las cinasas PI3K, PDK1, TOR y S6K de la ruta de transducción de señales de la insulina en mamíferos han sido reportadas en plantas (30).

### 1) Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)

Las PI3Ks se clasifican en tres clases con base en la homología de secuencias y la especificidad del sustrato *in vitro*. Las PI3Ks clase-I, fosforilan al fosfatidilinositol 4, 5 difosfato (PIP2) y están involucradas en el control del crecimiento, regulación del ciclo celular, síntesis de ADN, sobrevivencia celular y rearrreglos de actina. Las cinasas clase-II usan solamente fosfatidilinositol y fosfatidilinositol-4-fosfato como sustrato y se encuentran constitutivamente asociadas a estructuras de membranas (plasmáticas e intracelulares) y al núcleo. Varias líneas de evidencia sugieren una función de esta clase de cinasas en la transducción de señales mediada por agonistas, migración de células cancerígenas, supresión de muerte celular por apoptosis, exocitosis, organización del citoesqueleto y señalización de insulina (31). Las PI3Ks clase-III tienen como sustrato al fosfatidilinositol produciendo el fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) y el prototipo de esta enzima fue identificado primero en *Saccharomyces cerevisiae*, donde se requiere para la entrega de proteínas a la vacuola. Posteriormente, se descubrió un homólogo en humanos, el cual se encuentra en un amplio rango de eucariontes, incluyendo a *Dictyostelium*, *Drosophila* (32) y plantas (33). Estudios farmacológicos usando inhibidores de la PI3K como la wortmanina o el LY294002 en plantas, han mostrado la participación de PI3K en varios eventos fisiológicos que van desde el gravitropismo inducido por auxinas, la formación del hilo de infección en raíces de *Medicago trunculata* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti*, la respuesta al estrés salino en raíces de *Arabidopsis*, el cierre de los estomas inducido por ABA, la reorganización de la actina, y el crecimiento de los pelos radiculares (34). Evidencias genéticas y moleculares sugieren que la PI3K es crucial para el desarrollo vegetal, tanto de órganos vegetativos como reproductivos (31).

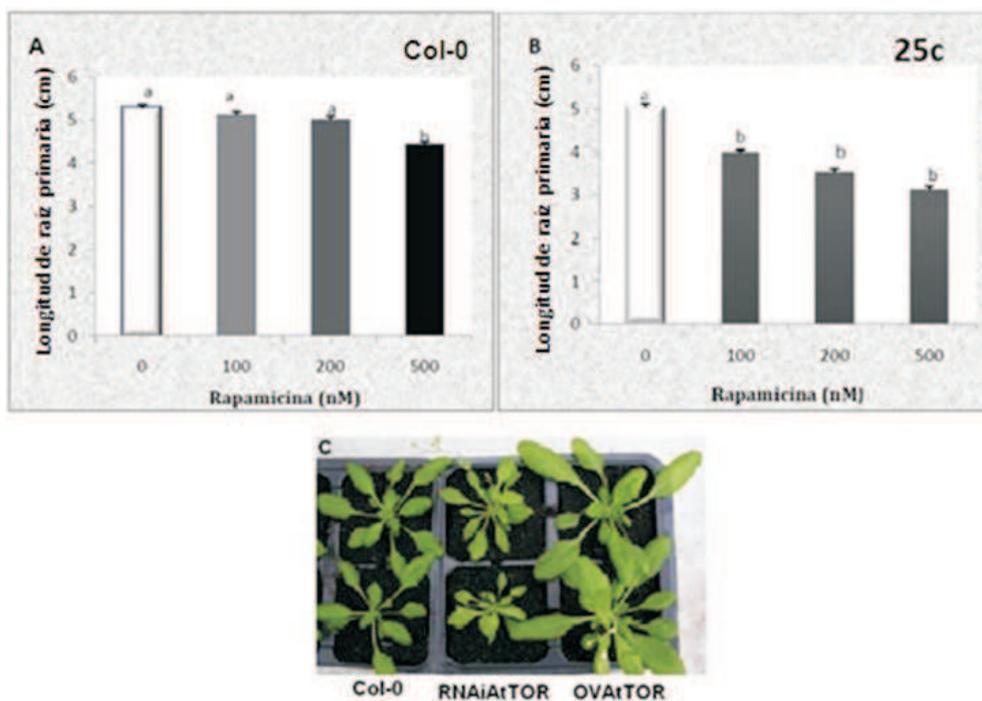
### 2) Proteína cinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos (PDK1)

La PDK1 de *Arabidopsis* (AtPDK1) fue identificada como un homólogo de la PDK1 de mamíferos, la cual está involucrada en el crecimiento y proliferación celular (35). Se ha observado que la AtPDK1 es capaz de complementar la mutación de PDK1 de levaduras, lo que sugiere la existencia de una función conservada de la PDK1 en eucariontes (30). Por otro lado, se ha reportado que AtPDK1 regula la fosforilación de AtS6K1 (36).

### 3) Proteína blanco de la rapamicina (TOR del inglés *Target Of Rapamycin*)

En lo que respecta a TOR, se encontró que el genoma de *Arabidopsis* cuenta con un solo gen que codifica para esta proteína y su mutación resulta letal para el embrión (37). Estudios posteriores mostraron que su expresión se localiza en sitios de proliferación celular como las zonas meristemáticas de la raíz y brotes. Por otro lado, se sabe que la susceptibili-

dad a rapamicina es generalizada entre eucariontes, sin embargo, *Arabidopsis* es insensible al fármaco. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína FKBP12, proteína que enlaza a la rapamicina para inhibir a TOR, en *Arabidopsis*, mostró que varios aminoácidos importantes para su unión con el inhibidor son diferentes a los de levadura y animales; es por ello que la interacción no se lleva a cabo. El grupo de Sormani (38) reportó que AtTOR se une *in vitro* a FKBP12 de *S. cerevisiae* (ScFKBP12). Los mismos autores crearon líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan la ScFKBP12, restableciendo así la sensibilidad a rapamicina (Fig. 2). Con el uso de líneas sobreexpresantes de AtTOR y de RNA de interferencia (RNAi) (30) se reportó que en *Arabidopsis* el crecimiento, el tamaño de las semillas, la resistencia a estrés osmótico, a ácido abscísico (ABA) y la sensibilidad a azúcares correlaciona con cambios en los niveles del mRNA de AtTOR (Fig. 2B). Interesantemente, utilizando la línea de RNAi de AtTOR se observó un crecimiento reducido y alterado, así como síntomas prematuros de senescencia en *Arabidopsis* (39). Otro estudio sobre el papel de TOR en plantas mostró que la interferencia de la señalización de TOR, induce cambios en las propiedades y estructura de la pared celular (40).



**Figura 2. El gen AtTOR regula el crecimiento celular.** A). Gráfica que muestra el efecto de la rapamicina en plántulas silvestres de *Arabidopsis* y en la línea 25c sensible a este inhibidor (B). C) Plántulas silvestres (Col-0), una línea silenciada por RNAi y otra de sobreexpresión de AtTOR crecidas por 36 días. Adaptada de (59) y (30).

#### 4) Cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K)

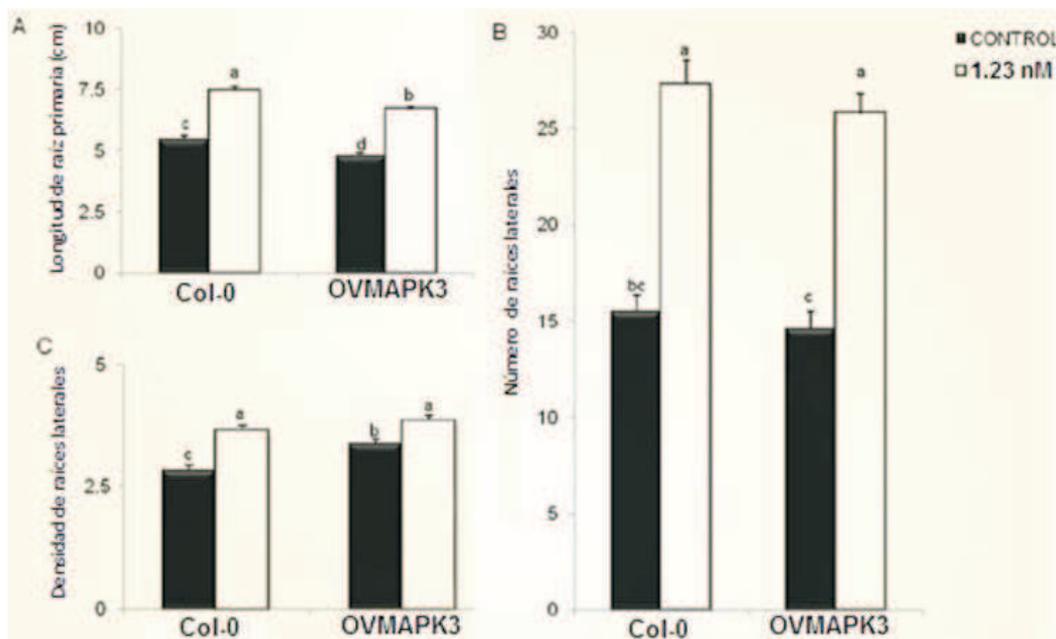
En *Arabidopsis* existen dos genes para la S6K: *S6K1* y *S6K2* que presentan una secuencia similar y un arreglo en tándem en el cromosoma 3. Al igual que en otros organismos, la S6K2 de *Arabidopsis* es fosforilada y activada por las cinasas TOR y PDK1, lo que ocasiona la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (PRS6) permitiendo así, el reclutamiento selectivo a polisomas de mRNAs para proteínas ribosomales y la regulación de la capacidad traduccional (41). También se encontró que la expresión de S6K2 es controlada por estrés osmótico y que su sobreexpresión en *Arabidopsis* hace a la planta hipersensible a dicho estrés (36). Por otra parte, se observó que cuando LS6K1 de *Lilium longiflorum* (homólogo de p70<sup>S6K</sup>) se sobreexpresa en plantas de *Arabidopsis*, se produce un desarrollo anormal de flores con estambres y pétalos cortos (42). Análisis posteriores también mostraron que la expansión y la velocidad de división celular sufrieron alteraciones en los pétalos y estambres de las plantas transgénicas. Estos resultados indican un nuevo papel de p70<sup>S6K</sup> en la regulación de la división celular y la expansión de pétalos y estambres por la regulación traduccional de transcritos expresados ectópicamente en *Arabidopsis*. Recientemente, se estudió la función de S6K1 y S6K2 en mutantes dobles de *s6k1s6k2/++* que muestran un incremento en el número de cromosomas y en el nivel de la proteína del retinoblastoma 1 (RB1) (43). Lo anterior sugiere que la cinasa S6K podría regular negativamente la división celular como parte de la cascada de señalización PI3K-TOR conectada a la vía que involucra a la RB1.

## 6. EXTRACTOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD HIPOGLUCÉMICA

Entre las numerosas especies vegetales con posible actividad hipoglucémica, algunas son ampliamente conocidas y desde hace siglos se utilizan en los países occidentales, como son la goma guar *Cyamopsis tetragonoloba* y la alholva *Trigonella foenum-graecum*; otras son menos comunes como *Momordica charantia*, *Gymnema silvestre* y *Ane-marrhena asphodeloides* (44). El efecto de 49 extractos de hierbas, especias y plantas medicinales se evaluó sobre la absorción de glucosa dependiente de insulina. Los resultados indicaron que la canela fue el producto más bioactivo seguido de las avellanas, te verde y negro, pimienta inglesa, hojas de laurel, nuez moscada, clavos, hongos, y levadura de cerveza (45). Por otro lado, extractos de hojas de las plantas *A. indica*, *C. roseus*, *G. silvestre* y *O. sanctum* mostraron un gran potencial para disminuir los niveles de glucosa en ratas normales y diabéticas (46). Se ha reportado que algunas plantas antidiabéticas pueden ejercer su acción por la estimulación de la función o número de células beta del páncreas, incrementando con ello la liberación de insulina (47).

## 7. LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE *ARABIDOPSIS* QUE EXPRESAN INSULINA

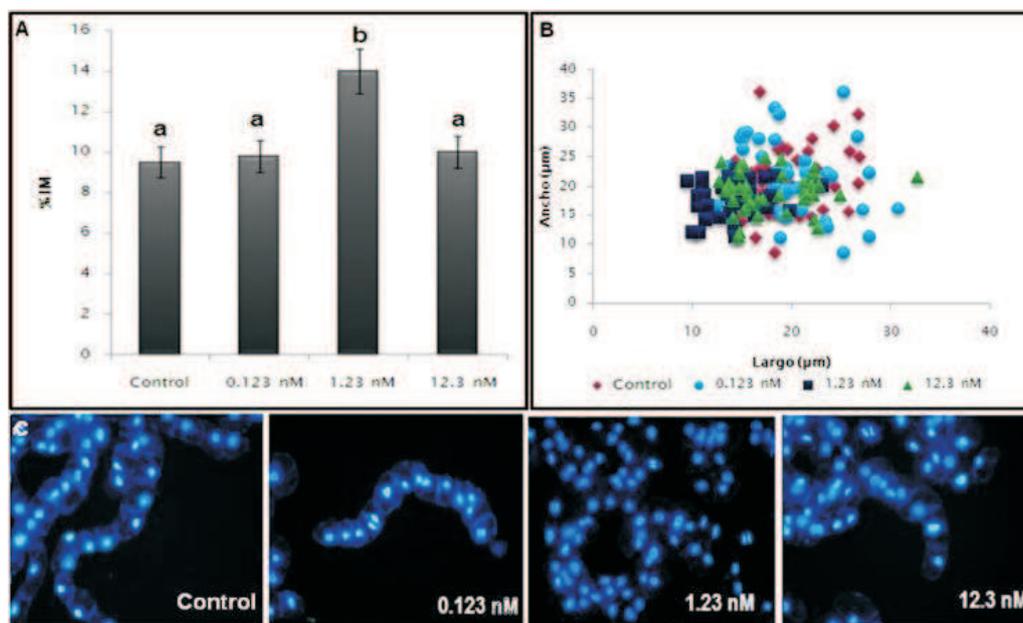
La insulina recombinante de humanos se ha obtenido a partir de una gran variedad de organismos incluyendo bacterias (48), levaduras (49), hongos (50), cultivo de células de mamíferos (51) y plantas transgénicas de *Carthamus tinctorius* y *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, la producción comercial está limitada al uso de *E. coli* y *S. cerevisiae* donde se alcanzan niveles de producción del orden de 5 toneladas anuales. Nykiforuk et al., (2006) utilizaron una tecnología de producción de insulina en plantas basada en los organelos subcelulares localizados en el retículo endoplásmico liso y conocidos como cuerpos grasos, que permitieron altos niveles de expresión y recuperación de proteínas recombinantes con un bajo costo. La tecnología antes mencionada permitió la obtención de semillas oleaginosas diseñadas genéticamente con las proteínas recombinantes unidas covalentemente a los cuerpos grasos. Con dicha estrategia se produjo insulina de humanos en *A. thaliana* con actividad biológica demostrada *in vivo* e *in vitro* (52).



**Figura 3.** Evaluación de la arquitectura radicular de plántulas silvestres y líneas que sobreexpresan el gen AtMAPK3 de *A. thaliana* en medio suplementado con insulina. Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron y crecieron por 13 días en medio MS 1X, 1% de sacarosa suplementado con 1.23 nM de insulina. A) Longitud de la raíz primaria; B) Número de raíces laterales C) Densidad de raíces laterales. Los valores representan la media de 15 plántulas analizadas en ensayos por triplicado. Las letras indican diferencia significativa obtenida por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias (LSD).

## 8. EFECTO DE LA INSULINA EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Los trabajos realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que la insulina aumenta la longitud de la raíz principal, el número de raíces laterales y la longitud de los pelos radiculares de *A. thaliana* a una concentración de 1.23 nM (Fig. 3), estos resultados concuerdan con los reportados en *Phaseolus vulgaris*, donde concentraciones crecientes de insulina bovina aumentaron la masa y tamaño de los epicótilos y raíces y el número de raíces laterales (53); al igual que en maíz (*Zea mays* L. cv. Chalqueño) donde la insulina aceleró la germinación y el crecimiento de las plántulas (27). Por otro lado, tenemos evidencias del efecto de la insulina sobre la cascada de señales de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) de *A. thaliana* (54). Otros estudios con *A. thaliana* y en cultivos de células de tabaco NT-1 en suspensión, mostraron que la insulina incrementó la longitud y la proliferación celular, respectivamente, a través de la activación de la cinasa PI3K (Fig. 4) (55, 56). Este tipo de crecimiento inducido por insulina, es también característico del efecto de las auxinas sobre la división y elongación celular (57) y un cruce de señales entre estas hormonas fue sugerido por Beltrán Peña et al., (2002), al encontrar que la auxina (AIA) al igual que la insuli-



**Figura 4.** Efecto de la insulina sobre el tamaño celular de los cultivos NT-1 en fase logarítmica. Las células de *Nicotiana tabacum* fueron crecidas en medio MS 1X (Control) suplementado con 0, 0.123, 1.23 y 12.3 nM de insulina. **A).** Porcentaje del índice mitótico. **B).** En el día 6 de la fase logarítmica se hicieron las mediciones celulares que se muestran en la gráfica de longitud (eje x) vs. ancho (eje y) n= 80. **C).** Imágenes representativas de las células con los diferentes tratamientos.

na, estimula la fosforilación de la proteína ribosomal S6 y el reclutamiento de mRNAs específicos a polisomas (58). El efecto de las auxinas en un cultivo de células en suspensión de *Arabidopsis* en fase estacionaria, mostró un incremento en la fosforilación de S6 y en la actividad de S6K al realimentar el cultivo con medio fresco, siendo las responsables de dichos efectos tanto la auxina ácido 1-naftalenacético como la cinetina, los autores también reportaron que un pre-tratamiento con anti-auxinas e inhibidores de la PI3K elimina dicha respuesta (41).

## 9. PERSPECTIVAS

La evidencia presentada con los modelos de estudio empleados en nuestro laboratorio en cultivos de células de tabaco en suspensión NT-1 y plantas de *Arabidopsis*, así como los experimentos actualmente en progreso, nos permitirán determinar los mecanismos de acción de la insulina y auxinas en la activación de las cascadas PI3K-TOR y MAPK en los procesos división, desarrollo y reproducción vegetal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, & Fletcher AA (1962) Pancreatic Extracts in the Treatment of diabetes mellitus: Preliminary Report. *Can Med Assoc J* 87(20):1062-1067.
2. Beauchamp MC, Yasmeen A, Knafo A, & Gotlieb WH (2010) Targeting insulin and insulin-like growth factor pathways in epithelial ovarian cancer. (Translated from eng) *J Oncol* 2010:257058.
3. Jastrzebski K, Hannan KM, Tchoubrieva EB, Hannan RD, & Pearson RB (2007) Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth Factors* 25(4):209-226.
4. Banting FB, CH; Collip JB; Campbell, WR; Fletcher, AA (1922) Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Preliminary report. *Can Med Assoc J* 12:141-146.
5. Murnaghan JH & Talalay P (1967) John Jacob Abel and the crystallization of insulin. *Perspect Biol Med* 10(3):334-380.
6. Lee J, Pilch PF, Shoelson SE, & Scarlata SF (1997) Conformational changes of the insulin receptor upon insulin binding and activation as monitored by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 36(9):2701-2708.
7. Voliovitch H, *et al.* (1995) Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in vivo depends upon the presence of its pleckstrin homology region. *J Biol Chem* 270(30):18083-18087.
8. Czech MP & Corvera S (1999) Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 274(4):1865-1868.

9. Etgen GJ, Valasek KM, Broderick CL, & Miller AR (1999) In vivo adenoviral delivery of recombinant human protein kinase C-zeta stimulates glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 274(32):22139-22142.
10. Saltiel AR & Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414(6865):799-806.
11. Ma XM & Blenis J (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(5):307-318.
12. Reiling JH & Sabatini DM (2006) Stress and mTOR signaling. *Oncogene* 25(48):6373-6383.
13. Roy S, *et al.* (1998) 14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 18(7):3947-3955.
14. Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80(2):179-185.
15. Rother KI (2007) Diabetes treatment—bridging the divide. *N Engl J Med* 356(15):1499-1501.
16. Eberhart MSO, C; Engalgau, M; Cadwell, B; Hedley, A A; Saydah, S H (2004) Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes-USA, 1988-1994 and 1999-2002. *Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 53:1066-1068.
17. Chakrabarti RR, R (2002) Diabetes and insulin resistance associated disorders: Disease and therapy. *Curr Sci* 83:1533-1538.
18. Choi K & Kim YB (2010) Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med* 25(2):119-129.
19. Wallace TM & Matthews DR (2002) The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med* 19(7):527-534.
20. Collip J (1923) Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. Preliminary paper. *J Biol Chem* 56:513-543.
21. Ellis MM & Eyster WH (1923) Some Effects of Insulin and Glucokinin on Maize Seedlings. *Science* 58(1513):541-542.
22. Khanna PN, TN; Jain, S.C; Mohan, SV (1974) Extraction of insulin from a plant source. 3rd International Congress on Plant Tissue and Cell Cultures. (Leicester, UK.).
23. Best CHS, M A (1923) Possible sources of insulin. *J Metabol Res* 3:177-179.
24. Ng TB, Wong CM, Li WW, & Yeung HW (1986) Insulin-like molecules in *Momordica charantia* seeds. *J Ethnopharmacol* 15(1):107-117.
25. Goodman DB & Davis WL (1993) Insulin accelerates the post germinative development of several fat-storing seeds. *Biochem Biophys Res Commun* 190(2):440-446.

26. Watanabe Y, *et al.* (1994) A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein. Isolation, primary structure and cDNA cloning. *Eur J Biochem* 224(1):167-172.
27. Sánchez de Jiménez E, Beltrán-Peña E, & Ortiz-López A (1999) Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol Plant* 105(1):148-154.
28. Rodríguez-Lopez CD, Rodríguez-Romero A, Aguilar R, & de Jimenez ES (2011) Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. *Protein Pept Lett* 18(1):84-91.
29. Saradha JS, K; Sridhar, GR; Subba, BR; Apparao, A (2010) Plant insulin: An in silico approach. *Int J Diab Dev Count* 30:191-193
30. Deprost D, *et al.* (2007) The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep* 8(9):864-870.
31. Lee YM, T; Lee, Y (2010) Plant phosphatidylinositol 3-kinase. in *Lipids Signaling in Plants*, ed Munnik T (Plant Cell Monographs. Springer Verlag, Berlin Heidelberg), pp 95-106.
32. Linassier C, MacDougall LK, Domin J, & Waterfield MD (1997) Molecular cloning and biochemical characterization of a Drosophila phosphatidylinositol-specific phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* 321:849-856.
33. Hong Z & Verma DP (1994) A phosphatidylinositol 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(20):9617-9621.
34. Lee Y, Bak G, Choi Y, Chuang WI, & Cho HT (2008) Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in root hair growth. *Plant Physiol* 147(2):624-635.
35. Otterhag L, *et al.* (2006) Arabidopsis PDK1: identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase. *Biochimie* 88(1):11-21.
36. Mahfouz MM, Kim S, Delauney AJ, & Verma DP (2006) Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* 18(2):477-490.
37. Menand B, *et al.* (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9):6422-6427.
38. Sormani R, *et al.* (2007) *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds Arabidopsis thaliana TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol* 7:26.
39. Guiboileau A, Sormani R, Meyer C, & Masclaux-Daubresse C (2010) Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *C R Biol* 333(4):382-391.

40. Leiber RM, *et al.* (2010) The TOR pathway modulates the structure of cell walls in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22(6):1898-1908.
41. Turck F, Zilbermann F, Kozma SC, Thomas G, & Nagy F (2004) Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134(4):1527-1535.
42. Tzeng TY, Kong LR, Chen CH, Shaw CC, & Yang CH (2009) Overexpression of the lily p70(s6k) gene in *Arabidopsis* affects elongation of flower organs and indicates TOR-dependent regulation of AP3, PI and SUP translation. *Plant Cell Physiol* 50(9):1695-1709.
43. Henriques R, *et al.* (2010) *Arabidopsis* S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1-E2F pathway activity. *Embo J* 29(17):2979-2993.
44. López-Luengo T (2002) Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante: características, administración y efectos adversos. *O F F A R M* 25:82-88.
45. Broadhurst CL, Polansky MM, & Anderson RA (2000) Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J Agric Food Chem* 48(3):849-852.
46. Chattopadhyay RR (1999) A comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin. *J Ethnopharmacol* 67(3):367-372.
47. Samad A, *et al.* (2009) Status of herbal medicines in the treatment of diabetes: a review. *Curr Diabetes Rev* 5(2):102-111.
48. Chan SJ, *et al.* (1981) Biosynthesis and periplasmic segregation of human proinsulin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(9):5401-5405.
49. Thim L, *et al.* (1986) Secretion and processing of insulin precursors in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(18):6766-6770.
50. Wang Y, *et al.* (2001) Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol Bioeng* 73(1):74-79.
51. Yanagita M, Nakayama K, & Takeuchi T (1992) Processing of mutated proinsulin with tetrabasic cleavage sites to bioactive insulin in the non-endocrine cell line, COS-7. *FEBS Lett* 311(1):55-59.
52. Nykiforuk CL, *et al.* (2006) Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnol J* 4(1):77-85.
53. Santos V (2003) Presencia de insulina en *Phaseolus vulgaris* L. c. v. Carioca. (Universidade Estadual Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ. ).

54. Juárez Domínguez ASM, R; Mellado Rojas, ME; Beltrán Peña EM (2010) Insulina estimula el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* a través de la cinasa MAPK3. *Biológicas* 12:14-19
55. Pascual-Morales E (2011) Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radiculares en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura (UMSNH, Morelia, Mich.).
56. Fierros-Romero GP-C, R; Mellado-Rojas ME; Beltrán-Peña EM (2010) Crecimiento de las células de *Nicotiana tabacum* NT-1 en suspensión activado por insulina. *Biológicas* 12:82-89.
57. Campanoni P & Nick P (2005) Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol* 137(3):939-948.
58. Beltrán-Peña E, Aguilar R, Ortiz-Lopez A, Dinkova TD, & De Jimenez ES (2002) Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiol Plant* 115(2):291-297.
59. García-Flores M (2010) Efecto de la rapamicina sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. Licenciatura (UMSNH, Morelia, Mich.).