

Evaluación preliminar de un sistema biológico eucariota (*Nicotiana tabacum*) escalable para la producción de insulina humana recombinante

Preliminary evaluation of a scalable eukaryotic biological system (*Nicotiana tabacum*) to produce recombinant human insulin

Carolina Centeno-Cerdas¹, Alina Jiménez-Rojas², Fabián Echeverría-Beirute³, Montserrat Jarquín-Cordero⁴


Fecha de recepción: 5 de abril, 2025
Fecha de aprobación: 29 de julio, 2025

Centeno-Cerdas, C; Jiménez-Rojas, A; Echeverría-Beirute, F; Jarquín-Cordero, M. Evaluación preliminar de un sistema biológico eucariota (*Nicotiana tabacum*) escalable para la producción de insulina humana recombinante. *Tecnología en Marcha*. Vol. 39 Nº 1. Enero-Marzo, 2026. Pág. 56-73.


 <https://doi.org/10.18845/tm.v39i1.7949>

1 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 ccenteno@tec.ac.cr


 <https://orcid.org/0000-0003-4600-8887>

2 Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 alina.j.r@estudiantec.cr


 <https://orcid.org/0000-0002-1540-6551>

3 Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo (CIDASTH). Escuela de Agronomía, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 fecheverria@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-7238-220X>

4 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 mocordero@tec.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-7926-7290>



Palabras clave

Diabetes; transformación genética; expresión génica; receptor de insulina; péptido señal.

Resumen

La diabetes mellitus es un problema de salud mundial cuyo tratamiento representa presión económica para los pacientes y los sistemas de salud pública. La producción de insulina, principal tratamiento de esta enfermedad es costosa y por ende se requieren métodos alternativos y económicos para aumentar su disponibilidad y efectividad para los pacientes. En este trabajo se emplearon plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) como modelo biotecnológico para introducir genéticamente los genes requeridos para sintetizar y liberar insulina humana. Para ello, la secuencia codificante se clonó en casetes de expresión nuclear y plastidial para material vegetal y su correcta inserción se verificó mediante análisis de PCR del ADN genómico de los clones derivados. Además, se cuantificó la expresión y liberación de proteínas recombinantes mediante ELISA. La concentración alcanzó niveles promedio de 800pmol/L en los sobrenadantes de los derivados del constructo pAF_ins, lo que confirma la efectividad de la transformación plastidial. Para probar preliminarmente la bioactividad de la hormona, se evaluó su capacidad para inducir la fosforilación de su receptor en células HepG2. Los resultados mostraron un aumento en la fosforilación después de la estimulación tanto con insulina recombinante disponible comercialmente (control positivo), como con la molécula recombinante secretada por las plantas de tabaco. No se observó fosforilación al estimular las células con el medio de inanición (control negativo) o extractos de plantas silvestres. Los resultados muestran que *N. tabacum* es una plataforma viable y apropiada para la producción de insulina humana recombinante en su configuración funcional para aplicaciones terapéuticas.

Keywords

Diabetes; genetic transformation; gene expression; insulin receptor; signal peptide.

Abstract

Diabetes mellitus is a worldwide health problem, and its treatment represents economic pressure for patients and public health systems. Thus, it is important to develop alternatives to produce insulin, the main treatment for this disease, to reduce its price and increase its availability and effectiveness, which implies direct patient benefits. In this work, leaves of *Nicotiana tabacum* were genetically modified to synthesize and release human insulin. For this purpose, the coding sequence was cloned in nuclear and plastidial expression cassettes for plant material. Its correct insertion was verified by PCR analysis of the genomic DNA of the derived clones. In addition, recombinant protein expression and release were quantified by ELISA. The concentration reached average levels of 800pmol/L in the supernatants of the pAF_ins construct derivatives, confirming the effectiveness of plastidial transformation. To preliminarily assess the bioactivity of the hormone, its ability to induce phosphorylation of its receptor in HepG2 cells was evaluated. The results showed increased phosphorylation after stimulation with commercially available recombinant insulin (positive control) and the recombinant molecule secreted by tobacco plants. No phosphorylation was observed upon the stimulation of cells with starvation medium (negative control) or wild-type plant extracts. The results show that *N. tabacum* is a viable and appropriate platform to produce recombinant human insulin in its functional configuration for therapeutic applications.

Introducción

La diabetes mellitus es una enfermedad humana endocrina que afecta los niveles normales de glucosa en sangre debido a la deficiencia relativa o absoluta de insulina, resistencia a esta hormona, o disfunción de las células β (productoras de insulina endógena) [1]. Existen dos tipos de diabetes diagnosticados con frecuencia: diabetes mellitus tipo I y tipo II; sin embargo, existen otros más como la diabetes gestacional, diabetes monogénica y formas secundarias de diabetes o de intolerancia a la glucosa que son diagnosticadas con menor frecuencia en la población [2].

La diabetes se considera una pandemia global, puesto que, según datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), aproximadamente 537 millones de adultos entre 20 a 79 años están diagnosticados con diabetes y para 2045 se espera que esta cantidad ascienda a 634 millones, sin contar los casos subdiagnosticados [1, 3]. Para el año 2019, la diabetes mellitus fue la causa directa del fallecimiento de 1.5 millones de personas [4, 5]. Según la Dirección de Vigilancia del Ministerio de Salud de Costa Rica, para noviembre del 2023 se diagnosticó en promedio 20 personas diarias con esta condición [6]. El diagnóstico de diabetes y otras presentaciones de intolerancia a la glucosa por lo general se acompaña de coexistencia, en una misma persona, de una o varias enfermedades o trastornos asociados a una enfermedad primaria como hipertensión, dislipidemia, retinopatía, neuropatía, padecimientos cardiovasculares, cáncer, depresión e incluso susceptibilidad a condiciones infecciosas como tuberculosis, virus de inmunodeficiencia humana, SARs-Cov-2, entre otras comorbilidades [1, 7-12], lo cual representa una disminución en la calidad y esperanza de vida de los pacientes, así como una carga económica y social para el resto de la población. Dichas comorbilidades son evitables manteniendo la glicemia estable, lo cual se puede lograr mediante intervenciones psicosociales o terapéuticas, siendo estas últimas basadas principalmente en la administración de insulina.

La insulina es una hormona peptídica sintetizada en el páncreas por las células β de los islotes de Langerhans como pre-proinsulina. La proinsulina está compuesta por el péptido C unido al extremo N-terminal de la cadena A y al extremo C-terminal de la cadena B [13, 14], que adquiere su estructura tridimensional en el retículo endoplasmático (RE) y luego se transfiere al aparato de Golgi en donde se acumula en vesículas para separar el péptido C de las cadenas A y B mediante acción enzimática [13, 15, 16]. Una vez separado el péptido C, la insulina es biológicamente activa y liberada al torrente sanguíneo en respuesta a la entrada de glucosa a las células β del páncreas. Al ingresar, la glucosa es fosforilada y oxidada en adenosín trifosfato (ATP) en las mitocondrias [15]. El ATP generado produce una despolarización de la membrana, lo que conlleva a un aumento de Ca^{2+} intracelular y un cambio de voltaje, induciendo la secreción de insulina y su transporte a tejidos diana como hígado, músculo y tejido adiposo [15, 17].

El mercado global de insulina fue valorado en el 2023 en USD 19.19 billones, y se estima crecerá hasta alcanzar los USD 25.08 billones para el 2032. Diversas compañías farmacéuticas han desarrollado dicho medicamento como un análogo o como la insulina tradicional humana, por lo que, además de una alta demanda, el mercado tiene una oferta creciente que se estima sea del 3.1% [18].

Inicialmente, la insulina para fines terapéuticos se obtuvo de tejidos porcinos y bovinos, sin embargo, causaba reacciones adversas debido a la diferencia estructural y molecular con respecto a la insulina humana [19, 20], además de que presentaba bajo rendimiento, alto costo, e inquietudes bioéticas [21]. El desarrollo de la ingeniería genética permitió la producción de insulina en bacterias (e.g. *Escherichia coli*) y levaduras (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), que han sido aprobadas para aplicaciones terapéuticas en humanos por la FDA [3, 19, 22, 23]. Estos sistemas de expresión presentan la ventaja de que su genoma está bien

caracterizado, presentan alta tasa metabólica y de crecimiento, y son rentables y fáciles de cultivar en biorreactor para su escalamiento [24, 25]. Sin embargo, son susceptibles a contaminación por endotoxinas, patógenos humanos, y no realizan modificaciones postraduccionales complejas requeridas para reproducir la bioactividad de la insulina humana [26, 27].

El producir insulina de secuencia humana en organismos eucariotas, como las plantas, representa una gran ventaja para los mercados, ya que podría mejorar su efecto terapéutico, disminución de efectos adversos, reducción de los tiempos y costos asociados y, por ende, mejorar la accesibilidad a una mejor calidad de vida para los pacientes. En el caso de específico de tabaco (*Nicotiana* sp), deferentes especies han sido usadas como modelo para procesos de mejoramiento genético [28], mediante técnicas como biobalística e infección por *Agrobacterium* [29]. *N. tabacum* permite la expresión estable de proteínas tanto en su genoma nuclear como plastidial, generando grandes cantidades de proteína soluble en comparación a otras especies vegetales [30]. Es una especie adaptable que no requiere condiciones especiales de cultivo [29], posee un ciclo de vida corto y al ser eucariota, realiza modificaciones postraduccionales complejas [30-32]. La expresión plastidial o citoplasmática permite gran acumulación de proteínas recombinantes, por lo que se ha convertido en una alternativa atractiva [33, 34]. La expresión nuclear presenta menor capacidad de acumulación, por lo que es usual añadir un péptido señal que dirija la proteína a otro compartimento subcelular para aumentar la acumulación, y evitar su degradación [32, 34]. *N. tabacum* se utiliza para la expresión de moléculas terapéuticas, vacunas y anticuerpos, dirigidos a enfermedades como cólera, ébola, cáncer, diabetes, rabia, hepatitis, y otras más para las que las moléculas recombinantes se encuentran en fase de ensayos clínicos corroborando su efectividad y seguridad [14, 30, 34]. La escalabilidad, rentabilidad, alta productividad y acumulación de proteína en los tejidos vegetales son definitivamente ventajosos del uso de tabaco como sistema de expresión [31, 33, 35]. Además, implica menores costos de extracción, recuperación y purificación de la proteína de interés debido a que se secreta en su forma biológicamente activa [1, 31, 35].

De esta manera, en el presente trabajo se buscó evaluar un sistema de producción de insulina en cloroplastos o núcleo de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*), empleando dos péptidos señal distintos derivados de *Arabidopsis thaliana* y de *N. tabacum* para la secreción y recuperación eficiente y rentable de la hormona recombinante humana, realizando además pruebas preliminares para evaluar la factibilidad y escalabilidad de esta propuesta.

Metodología

Diseño del constructo

Con el fin de determinar la secuencia del gen de insulina A humana, se utilizó la base de datos UniProt de donde se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la proteína (material suplementario Fig S1.). A partir de dicha secuencia se utilizó el banco de datos del National Center of Biotechnology Information, en su plataforma Consensus CDS protein set (CCDS) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&GO=MainBrowse&DATA=CCDS7729.1>, accesado en febrero 2020), para obtener la secuencia de nucleótidos para la expresión de insulina (Material suplementario Fig. S2).

A la secuencia de nucleótidos se le realizó una optimización de codones ajustando el marco de lectura humano al de *N. tabacum*, para lo cual se empleó la herramienta Codon Optimization Tool de la empresa IDT (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>, accesado en marzo 2020), de esta manera se obtuvo la secuencia final a utilizar (Material suplementario Fig. S3).

Posteriormente, se evaluaron los posibles péptidos señal para la expresión en tabaco, de manera que permitiesen secretar la insulina a su medio circundante. A partir de esto se escogió la secuencia presente en la peptidasa de secreción extracelular conocida como ARA12 (constructo Ara_ins) reportada previamente en suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana* [36, 37], el péptido señal de la proteína relacionada con la patogénesis de tabaco PR-1a para la secreción al RE (constructo PR1_ins)[38] y, el diseño para el constructo de expresión plastidial (pAF_ins).

Una vez identificadas todas las piezas genéticas, se procedió con su diseño completo bioinformático, utilizando el promotor *Psba* y la región KOZAK, la cual es comúnmente usada como secuencia de iniciación de la transcripción en organismos eucariotas, generando los constructos Ara_ins y PR1_ins, así como el constructo pAF_ins. Este proceso se llevó a cabo con la plataforma Benchling (<https://www.benchling.com/>) y se sintetizaron por la empresa Twist Biocience.

Transformación de tabaco mediante bombardeo y selección de las plantas transgénicas

Se bombardearon hojas de plantas de *N. tabacum*, suministradas por el Laboratorio de Biotecnología de Plantas (LBP) del CIDASTH (Escuela de Agronomía, ITCR, San Carlos) (Material suplementario Fig. S4A), empleando un sistema de biobalística a baja presión por medio del mecanismo de aceleración PIG (“Particle Inflow Gun”), (fabricado en México y modificado en el Laboratorio BIOTEC de la Escuela de Ciencias y Letras, ITCR San Carlos) (Material suplementario Fig. S4B,) de acuerdo con el protocolo descrito por Daniell, 1997 [39]. Se utilizaron partículas de oro de 0.6 µm de diámetro recubiertas con las muestras del ADN de distintos vectores de transformación nuclear (Ara_ins; PR1_ins) o plastidial (pAF_ins).

Después del bombardeo, las hojas se dejaron en oscuridad durante 48 horas a 25°C. Posteriormente, se seccionaron en fragmentos de tallo y hoja y se colocaron en medio con sales MS [40], con 30g/l de sacarosa 0,1mg/l de Bencialaminopurina, 100 mg/l de tiamina y 1.8 g/l Agar, pH 5.8 (medio RMOP); y suplementado con 500 mg/L de espectinomicina (agente de selección). Las condiciones de cultivo fueron 25°C, intensidad lumínica de 120 µmol/m²/s y un fotoperiodo de 16 horas luz. Se realizaron tres bombardeos de cada constructo en tres momentos distintos.

Procurando homoplasma, los brotes regenerados a partir de las hojas se sometieron a una segunda ronda de selección. Los brotes regenerados se transfirieron a medio de cultivo con espectinomicina (500mg/L) con el fin de mantener la presión de selección. Las plantas desarrolladas se cultivaron en una cámara de crecimiento (Sanyo MIR-6553, Osaka, Japan) en condiciones de 25 ± 1°C, 250µmol/m²/s, 90% humedad relativa, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Una vez confirmada la homoplasma, las plantas seleccionadas se cultivaron *in vitro* en medio P3 (sales MS, 30g/l de sacarosa y solidificado con 1.8g/l Phytigel, pH 5.8) suplementado con espectinomicina (P3-Spec) para la realización de estudios posteriores.

La integración del gen recombinante se verificó mediante la técnica de PCR, empleando *primers* específicos FW 5- GACCCAGCTGCTGCTTT-3 y REV 5- TGGTACAGCATTGTTCCACA-3 diseñados mediante la herramienta bioinformática PrimerQuest™ Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest?returnurl=%2FPrimerquest%2FHome%2FIndex>) (IDT Integrated DNA Technologies, IO, USA).

Escalamiento de células transformadas de *N. tabacum*

El establecimiento de suspensiones celulares se realizó en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), a partir del callo friable de material no transformado, así como en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas (LBP) del CIDASTH (Escuela de Agronomía, ITCR, San Carlos) y en el Centro de Investigación en Biotecnología (Escuela de Biología, ITCR, Cartago) para el material transformado.

Se indujo la formación de callos de las plantas transformadas y no transformadas empleando medio MS con 2mg/L de ácido naftalenacético (ANA) y 0.2mg/L de ácido bencilaminopurínico (BAP). Para el mantenimiento de los callos se trabajó con el medio de cultivo semisólido reportado por [41] y el mismo medio, pero sin gelificante, se empleó para el establecimiento de suspensiones celulares.

Para dichas suspensiones se pesaron 3 g de callo friable y se les agregó 50 mL de medio de cultivo. Se incubaron en condiciones de oscuridad y agitación orbital de 100 rpm para su disgregación, a una temperatura aproximada de 25°C. Posteriormente, las suspensiones se tamizaron a 2mm conservando la solución de células.

Extracción de proteínas totales de plantas

Para el análisis de proteínas, con ayuda de nitrógeno líquido se pulverizaron hojas de las plantas de tabaco. A 300mg del material vegetal pulverizado se añadió 1200µL de buffer de extracción (0.01M Na₂HPO₄, 0.05M NaH₂PO₄, 0.5M NaCl y 1%(v/v) Triton X-100) e inhibidores de proteasas (complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Basel, Switzerland), se agitó por 30 minutos a 4°C, y se separó mediante centrifugación a 20 000g a 4°C por 10 minutos (Mikro 200 R, Hettich, Tuttlingen, Germany). Se conservaron los precipitados y los sobrenadantes para su posterior análisis mediante un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) en el caso de la insulina y mediante el BCA para las proteínas totales.

Cuantificación de proteínas

Para la evaluación de proteínas totales y de la insulina recombinante se extrajeron las proteínas a partir de los extractos de hojas (sobrenadantes y precipitados), mediante el protocolo descrito en el apartado anterior, y se utilizaron los kits BCA Protein Assay protocol (SC-202389, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) y Human/Canine/Porcine Insulin DuoSet ELISA (DY8056, R&D Systems, MI; USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando el equipo FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH. Ortenberg, Germany) para la determinación de la absorbancia.

Preparación de extractos vegetales

Se extrajeron proteínas a partir de 2.5g de material vegetal de cada uno de los constructos y de la planta control, a los cuales se adicionó buffer PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1.8mM), se centrifugó por 15 min a 4°C a 14 000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes para luego concentrarlos mediante el uso de columnas Amicon®Ultra-15 (Ultracel ® -30k, UFC9030, Merck Milipore Ltd, Cork, Irlanda) por 2 horas a 4°C a 4000 rpm (Sorvall Legend X1R, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Los extractos se resuspendieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma D6546, UK) e inmediatamente fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su aplicación a las células de carcinoma hepatocelular HepG2.

Cultivo celular

Con el fin de analizar la actividad biológica de la insulina recombinante se cultivó la línea celular hepática HepG2 (HB-8065™ facilitada por el departamento de bioquímica de la Universidad de Costa Rica). Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Sigma Aldrich D6546, UK) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma Aldrich, F0926, St Louis, USA), 1% penicilamina/estreptomicina (Sigma Aldrich, P4333) y 2% L-glutamina (Sigma Aldrich, G7513), bajo condiciones de 37°C, 5% de CO₂ y 100% humedad.

Estimulación de las células

Para evaluar la fosforilación de los receptores de las células hepáticas inducida por los extractos de plantas de tabaco que expresaban insulina, se sembraron las células HepG2 en placas de 12 pozos en una densidad de $1 \cdot 10^5$ durante 24 horas en el medio antes descrito, y posteriormente se dejaron en inanición por 16 h con medio DMEM sin suplementar, para luego aplicarles los medios condicionados (DMEM:extracto en proporción 1:2) con las proteínas recombinantes (Ara_ins, Pr1_ins, pAF_ins), insulina comercial (Novolin® R, Novo Nordsik, [Bagsværd, Dinamarca](#)) como control positivo, y DMEM con extracto de planta silvestre como control negativo. Los tiempos de exposición utilizados fueron 15, 20 y 30 minutos, con condiciones de cultivo de 37°C, humedad de 100% y 5% de CO₂. Posteriormente se descartaron los medios y las placas con células fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para su posterior análisis.

Extracción de proteínas y determinación de la fosforilación del receptor

Las células HepG2 se lisaron en frío con buffer RIPA (25 mM Tris•HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) suplementado con inhibidores de fosfatasa (Phosphatase Inhibitor Mini Tablets; Pierce-Thermo Fisher Scientific Inc, IL, USA) e inhibidores de proteasas (complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Basel, Switzerland). Las células fueron separadas desde el fondo del pozo y los lisados se homogenizaron por pipeteo para ser recuperados para su análisis.

La actividad biológica de la insulina recombinante se evaluó mediante la determinación de la fosforilación del receptor de la hormona, utilizando el kit Human Phospho-Insulin R ELISA DuoSet IC (DY2718, R&D Systems, MI, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Resultados y discusión

Debido a la epidemia cada vez mayor que representa la diabetes a nivel mundial, la comunidad científica ha buscado estrategias para la producción de insulina, lo cual ha sido evidente desde el descubrimiento de la hormona en 1921 por Frederick G. Banting y Charles H, pasando por la década 70-80's, cuando se produjo la primera insulina recombinante y cada vez más hasta la fecha [42].

Entre los aspectos considerados para la selección de un sistema de expresión se incluyen: características propias de la proteína de interés, las modificaciones postraduccionales requeridas, tamaño del gen a insertar, tamaño del genoma de la célula hospedadora, capacidad de expresión, estabilidad del gen, tasa de crecimiento celular y condiciones necesarias para su mantenimiento [43]. Las bacterias y levaduras son aptas para una rápida (días) o moderada (semanas) expresión, producen altas densidades de biomasa con bajos costos de producción, los medios de cultivo son poco complejos, y ofrecen alta escalabilidad, sin embargo, su

capacidad para realizar modificaciones postraduccionales complejas como las glicosilaciones es limitada, a diferencia de las células vegetales y animales que sí realizan estas modificaciones a pesar de que ofrecen mayor complejidad para establecer procesos de escalamiento [26, 44].

Las modificaciones postraduccionales y el correcto plegamiento son indispensables para la solubilidad y bioactividad de las proteínas eucariotas recombinantes [45, 46]. Por consiguiente, la producción de proteínas recombinantes contribuye a la mejora de las condiciones de salud con el desarrollo de vacunas, anticuerpos y fármacos funcionales, personalizados, puros, seguros y de calidad para el tratamiento de enfermedades crónicas, tumores, cáncer, infecciones bacterianas o virales, entre otras [47].

En el caso de la insulina obtenida en *E. coli* se produce en cuerpos de inclusión donde se encuentra mal plegada, por lo que, las células deben ser recuperadas para extraer los cuerpos de inclusión, lavarlos y solubilizar las moléculas precursoras de la proteína. Posteriormente, mediante reacciones enzimáticas se debe plegar la molécula y formar los enlaces disulfuro [3, 48]. Para obtener un producto puro y seguro para el uso humano, en este proceso se deben eliminar remanentes de la célula hospedadora, subproductos generados, ácidos nucleicos y reactivos usados en el proceso de *downstream*, por lo que resulta altamente costoso [3, 24].

Además del tabaco, otras plantas que han sido usadas para la producción heteróloga de insulina incluyen el arroz (*Oryza sativa* L.) y maní (*Arachis hypogaea* L.), con resultados prometedores para ser consideradas como sistema de administración oral de la hormona [49, 50]. Debido a estos y otros antecedentes [51, 52, 53], nuestro grupo planteó la alternativa de la expresión de la insulina en cloroplastos o a nivel nuclear, empleando dos péptidos señal distintos derivados de *A. thaliana* y de *N. tabacum* para la secreción de la hormona, y realizó además pruebas preliminares para evaluar su factibilidad.

Transformación de tabaco mediante bombardeo y selección de las plantas transgénicas

Al evaluar el material transformado a los 15 días de crecimiento se observaron las diferencias de crecimiento en medio RMOP con espectinomicina, entre los transformantes y los no transformantes, evidenciando los casos de transformación exitosa (Material Suplementario Fig. S 5).

Verificación de la integración del gen de insulina y selección de las plantas transgénicas

En la figura 1A se muestra la integración exitosa de las secuencias de interés en el genoma vegetal, tanto plastidial como nuclear. Se obtuvieron productos de PCR de tamaño esperado según los imprimadores diseñados, para un fragmento de 245pb. Además, dichos resultados muestran que el material vegetal modificado genéticamente cultivado *in vitro* fue capaz de expresar la insulina recombinante.

Determinación de la insulina recombinante

Con el fin de comprobar la expresión de la insulina se analizaron los sobrenadantes y precipitados de los extractos proteicos de las líneas transformantes mediante la técnica de ELISA. En la figura 1B se muestra que la proteína recombinante se recuperó mayoritariamente a partir de los sobrenadantes. A pesar de no observarse diferencias estadísticamente significativas entre los transformantes Ara_ins y pAF_ins, es posible afirmar que el promedio de secreción de este último es aproximadamente 1.2 veces superior al de Ara_ins. Por otro lado, el transformante Pr1_ins presentó los menores rendimientos tanto para sobrenadantes (secreción) como para los precipitados.

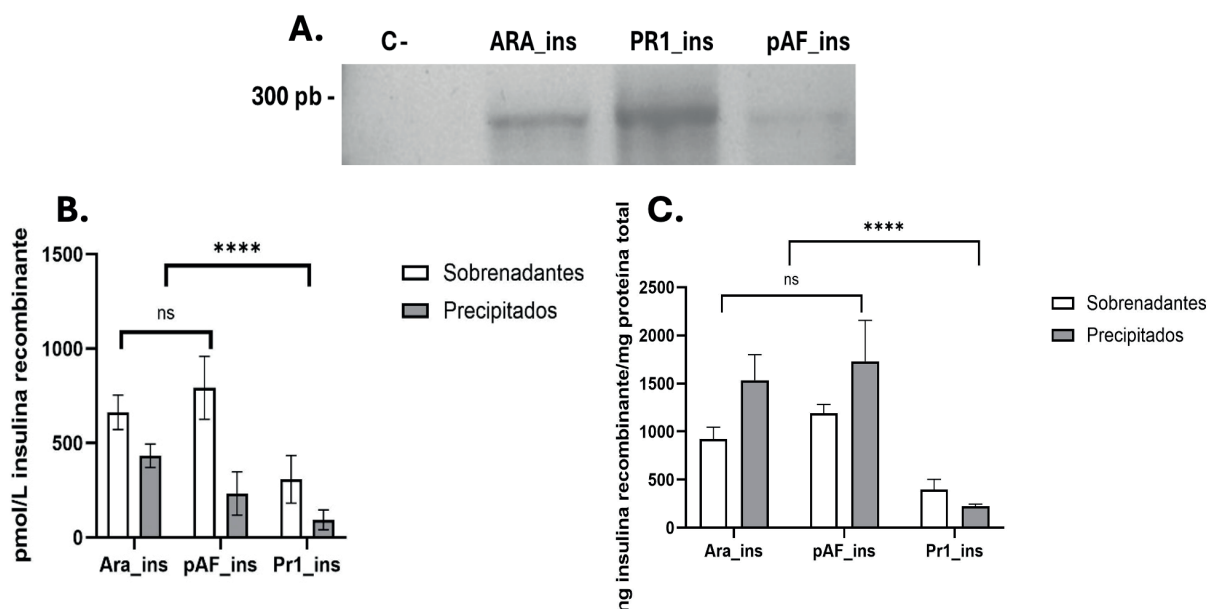


Figura 1. Expresión de la insulina recombinante en plantas de *N. tabacum*. A. Integración del transgén de la insulina al genoma de las plantas de tabaco. Tamaño esperado del codón que expresa la insulina humana para cada uno de los constructos en *N. tabacum*, una planta no transformada fue usada como control negativo. B. Evaluación de insulina recombinante en sobrenadantes y precipitados mediante ELISA. C. Comparación de la insulina producida con respecto a la proteína total recuperada de plantas de *N. tabacum*. Evaluación de insulina recombinante en sobrenadantes y precipitados mediante ELISA. Los rendimientos de secreción se calcularon a partir de las concentraciones de proteínas obtenidas por ELISA (precipitados: gris; sobrenadante: blanco) y demostró ser significativamente mayor para los clones derivados de ARA_ins y pAF_ins en comparación con el clon PR1_ins, que mostró el peor rendimiento. *p ≤ 0.05 **p ≤ 0.005, ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001

Para una mejor comprensión del comportamiento de los transformantes, se analizó comparativamente cuánto de la proteína total corresponde a insulina. En la figura 1C se muestra que la mejor expresión se obtuvo con los clones ARA_ins y pAF_ins, siendo que la relación de ng de insulina por cada mg de proteína total es alta tanto en sobrenadantes como en precipitados, mientras que para el transformante derivado de PR1_ins, la relación es proporcional, puesto que, su producción de proteína total es baja. A pesar de ello, se recupera más proteína recombinante en los sobrenadantes que en los precipitados.

Según lo esperado, al ser el constructo pAF_ins (figura 1B) dirigido a la transformación plastidial, ocurre la acumulación de altos niveles de proteínas recombinantes, con bajas posibilidades de silenciamiento de la expresión genética. La capacidad de síntesis de enzimas involucradas en vías metabólicas completas por estas organelas ha sido un atractivo para su uso desde hace varias décadas [33, 54, 55].

El vector utilizado para la transformación plastidial fue el pAF, que ha sido usado con éxito en la expresión del gen EDA y del gen L1 del virus del papiloma humano [56, 57]. En el sitio de clonación múltiple de este vector se insertó la secuencia de la insulina, que se expresó bajo el control transcripcional del promotor constitutivo plastidial del gen *psbA* de tabaco, fusionado a su 5'UTR y la región KOZAC del terminador del gen *psbA*. La integración de los genes se hizo por recombinación homóloga entre los genes *trnI* y *trnA*. Al estar la zona de inserción en la región invertida repetida, cada plastoma contiene dos copias de los genes de interés como resultado del proceso de corrección de copia de los plastidios, lo cual tiene un impacto directo en la cantidad de proteína recombinante derivada de este vector [58].

Por su parte, los vectores utilizados para la transformación nuclear fueron Ara_ins y PR1_ins (ambos con péptido señal) [36, 38], también bajo el control transcripcional del gen *psbA* de tabaco fusionado a su 5'UTR y la región KOZAC y del terminador del gen *pbsA*, sin embargo, las plantas transformadas derivadas de estos constructos tuvieron comportamientos distintos en cuanto a expresión de la hormona y a su actividad biológica.

Para el constructo Ara_ins se esperaba una secreción similar a la presentada por el constructo plastidial, como se observa en la figura 2A, ambos diseños genéticos están enfocados a la expresión génica y su secreción fuera de la célula, lo cual, para efectos de escalamiento y producción farmacológica, resulta de gran utilidad al facilitar la recuperación de la proteína de interés con respecto a la acumulación en otros compartimentos celulares [59].

De esta manera, Ara_ins y pAF_ins presentan mejores resultados que Pr1_ins, siendo los valores de pAF_ins 1.3 veces superiores a los de Ara_ins en lo que respecta a los sobrenadantes. Por su parte, en lo referente a los precipitados, la mayoría de la proteína presente corresponde a insulina que no logró secretarse, salvo para Pr1_ins en cuyo caso la concentración en el sobrenadante es superior a la del precipitado.

El uso de la proteína relacionada a la patogénesis del tabaco (PR1) presentó los menores rendimientos, tanto para sobrenadantes como para precipitados, lo cual podría deberse a una disminución de su actividad, como se ha reportado en estudios anteriores que buscaban la secreción de moléculas al RE [60, 61]. Asimismo, el RE, tiene sus propios mecanismos de control que degrada proteínas mal ensambladas o reconocidas como extrañas, lo cual pudo haber sucedido con la insulina recombinante producida por las plantas derivadas de este constructo [55].

En la investigación de Boyhan y Daniell (2011) [52], reportaron como satisfactorios porcentajes entre 40 y 50% de proteína recombinante en las hojas maduras de tabaco a partir de transformaciones genéticas en los plastomas. Como se observa en la figura 2B, alrededor de 40% de la proteína total de los clones derivados de Ara_ins y pAF_ins corresponde a insulina recombinante en los sobrenadantes y para el caso de la Pr1_ins, esta proporción alcanza el 60%, lo cual indica que este constructo, a pesar de producir poca proteína total, expresa mayor proporción de la proteína de interés.

Escalamiento de células transformadas de *N. tabacum*

El cultivo del material regenerado en medio RMOP con espectinomicina permitió identificar los transformantes, y se requirió realizar rondas de selección adicionales en medio P3-Spec para alcanzar la homoplasma. Siendo que los brotes se regeneran a partir de una o pocas células, la regeneración de la planta es un tejido quimérico, por lo tanto, se debe mantener la presión de selección para garantizar obtener el 100% de los cloroplastos transformados [62].

Como paso previo al establecimiento de suspensiones celulares, se desarrolló el protocolo de callogénesis, con resultados comparables a los reportados por Campos-Delgado (2015) [41]. Si bien el crecimiento celular mostró un patrón normal, a partir del día 15 de cultivo se tuvo contaminación fúngica y bacteriana que resultó recurrente, lo cual limitó el crecimiento y provocó toxicidad y muerte celular (Material Suplementario Fig. S6). Varios autores han reportado la posibilidad de contaminación latente que se activa al modificarse las condiciones de cultivo [63], como en este caso al cambiar de callo a suspensión celular. La contaminación endógena repercute negativamente en el establecimiento de cultivos a mayor escala, por lo que se desechó el material en este punto.

Si bien el uso de las plantas como biofactorías para la producción de proteínas recombinantes ha sido reconocida por su bioseguridad, pues presentan un bajo riesgo de contaminación del producto por virus de mamíferos, patógenos transmitidos por la sangre, oncogenes y toxinas bacterianas; los problemas derivados de la contaminación endógena suelen ser un desafío para el establecimiento de suspensiones celulares que permitan una optimización de dicha producción [64, 65].

Aunado a ello, se ha documentado que algunas plantas como *N. tabacum* pueden producir compuestos tóxicos como el alcaloide de nicotina, lo cual implica que se requiere que el producto biofarmacéutico sea sometido a procedimientos de purificación para la eliminación del alcaloide y garantizar la calidad del fármaco. Se ha reportado la eliminación del alcaloide con el uso de la tecnología CRISPR/Cas9, la cual permitió niveles de nicotina de hasta un 99,6% más bajos [65].

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este periodo indican la factibilidad de la estrategia planteada para la producción de insulina humana recombinante incluyendo un péptido señal en este modelo vegetal.

Actividad biológica de la insulina recombinante

El receptor de la insulina pertenece a la familia de tirosina quinasas. La insulina se une con alta afinidad y un alto grado de especificidad, lo que lleva a la autofosforilación del RI en residuos de tirosina para reclutar y fosforilar proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS) como PI3K, requeridas para continuar la cascada de transducción [66, 67], modificando el metabolismo intracelular y la expresión génica [68]. De manera preliminar, mediante análisis semicuantitativo de ELISA, se evaluó la funcionalidad biológica de la insulina recombinante secretada por cada cepa para identificar la capacidad de la hormona para unirse e inducir la fosforilación de su receptor en las células hepáticas. Los sobrenadantes de cada transformante fueron concentrados y normalizados a igual cantidad de proteína y se utilizaron para estimular las células hepáticas HepG2, según se observa en las figuras 2A y 2B.

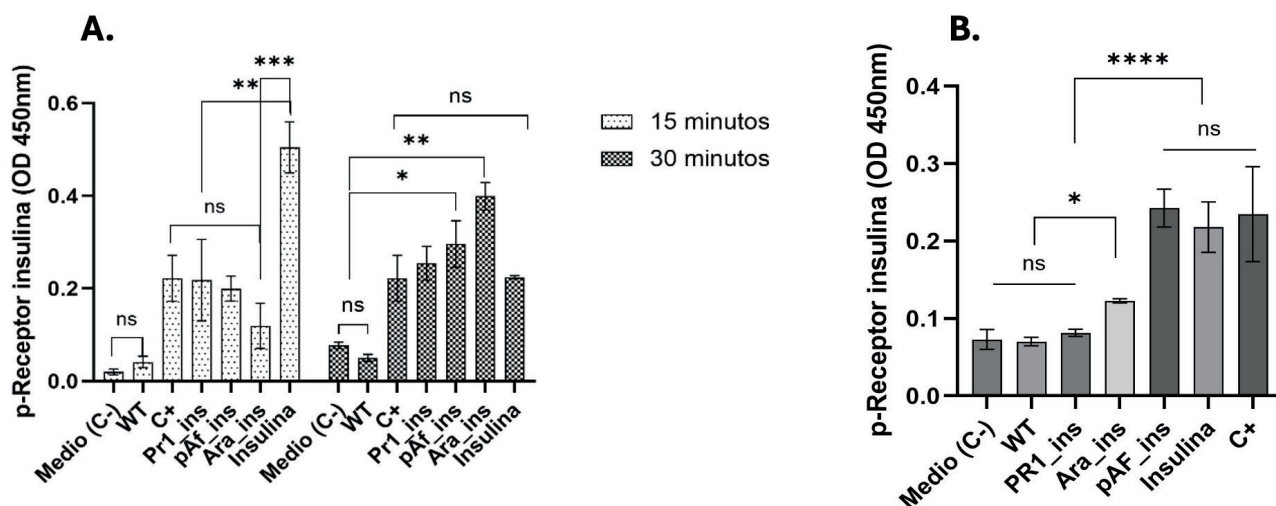


Figura 2. Actividad biológica de la insulina recombinante producida por *N. tabacum*. La actividad biológica de la proteína recombinante se evaluó para cada cepa transgénica con base en la detección y cuantificación de la fosforilación del receptor de insulina en las células HepG2. A. La exposición para inducir la activación de los receptores se realizó por 15 y 30 minutos. B. La exposición para inducir la activación de los receptores se realizó por 20 minutos. Se realizó un análisis estadístico con respecto al control negativo (medio de inanición) y para determinar las diferencias entre las cepas generadas. Se utilizó una insulina recombinante disponible comercialmente como control positivo (c+, 50 ng/ml). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Se encontró que, con 15 minutos de exposición, la insulina comercial tiene mayor acción sobre los receptores que las generadas por los transformantes derivados de *N. tabacum*, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos y el control positivo interno de la prueba. Por otra parte, con exposición de 30 minutos, la fosforilación de los receptores inducida por la insulina comercial disminuye, mientras que aumenta la actividad biológica de la insulina secretada por los transformantes de *N. tabacum*. Se realizó nuevamente el ensayo por 20 minutos, obteniendo que el extracto del transformante plastidial pAF_insulina presenta una actividad biológica similar a la insulina comercial, aproximadamente 1.8 veces superior al constructo Ara_ins y casi 2.5 veces superior al PR1_ins, el cual se comportó de manera similar a los controles positivos del ensayo.

El dominio de unión de la molécula de insulina se compone de porciones distantes de las cadenas A y B, que se unen en una superficie como resultado del plegamiento tridimensional para formar la región de unión al receptor [68]. Como se observa en la figura 2, en todos los casos e independientemente del tiempo de exposición, la insulina recombinante derivada de los clones transformantes fue capaz de inducir la fosforilación del receptor, lo cual indica que los procesos de transcripción, traducción y modificaciones postraduccionales ocurridos sobre la proteína son apropiados. No obstante, esto debería verificarse posteriormente mediante otras técnicas analíticas.

Es importante mencionar que el receptor de la insulina es una molécula compuesta por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana unidas por enlaces disulfuro [69]. Cuando la insulina se une al receptor realiza un cambio conformacional y la autofosforilación en la región Y972 de la subunidad β para el reclutamiento de las proteínas sustrato y activación de cascadas como la PI3K-AKT para la captación de glucosa [70,71].

Esta autofosforilación del receptor permite que las proteínas efectoras se acoplen en sitios específicos para desencadenar la señalización de la insulina [72, 73]. Esto genera modificaciones en el metabolismo como la inhibición de la producción de glucosa en el hígado, captación de glucosa y síntesis de glucógeno en el músculo y en el tejido adiposo inhibe la lipólisis [74].

En estudios anteriores se ha descrito que, entre más de 200 análogos de insulina analizados, existe una alta correlación entre la afinidad de unión al receptor y el efecto biológico [68], por lo que en este caso también se podría esperar que la insulina producida por nuestro grupo sea capaz de desencadenar la respuesta fisiológica normal al ser suministrada *in vivo* a sujetos humanos.

Conclusiones

Como ha sido caracterizado anteriormente, las plantas de tabaco presentan múltiples ventajas para ser utilizadas como plataforma de expresión de proteínas humanas recombinantes, incluyendo el bajo costo de producción, alta tasa de generación de biomasa, su capacidad de generar modificaciones postraduccionales complejas, ser libres de endotoxinas, la posibilidad de escalabilidad, y la seguridad de que pueden ser cultivadas en ambientes controlados, lo que minimiza el riesgo de contaminación con patógenos humanos.

Los resultados de esta investigación señalan que, para la producción de insulina recombinante en plantas de tabaco, es más recomendable el uso de un constructo de transformación plastidial que uno de transformación nuclear, pues su rendimiento es relativamente superior. Adicionalmente, con esta prueba de concepto se generó información preliminar del beneficio de incluir un péptido señal, de que la estrategia es escalable, y de que esto no afecta la actividad biológica de la hormona, ya que induce la autofosforilación de su receptor de manera similar a como lo hace la insulina comercial.

Agradecimientos

Los autores agradecen al M.Sc. Cristopher Orozco por su colaboración en la implementación de suspensiones celulares, y a los estudiantes asistentes involucrados en el proyecto, pues gracias a su valioso aporte se logró desarrollar este trabajo. Los investigadores agradecen además a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR, que apoyó económicamente el desarrollo de este trabajo mediante el CF 1510129. Igualmente, se agradece y recuerda al ingeniero y amigo David García Gómez (D.E.P.).

Referencias

- [1] J. B. Cole and J. C. Florez, "Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications," (in eng), *Nat Rev Nephrol*, vol. 16, no. 7, pp. 377-390, Jul 2020. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>
- [2] D. N. Koye, D. J. Magliano, R. G. Nelson, and M. E. Pavkov, "The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease," (in eng), *Adv Chronic Kidney Dis*, vol. 25, no. 2, pp. 121-132, Mar 2018. doi:10.1053/j.ackd.2017.10.011
- [3] Y. Y. Siew and W. Zhang, "Downstream processing of recombinant human insulin and its analogues production from E. coli inclusion bodies," (in eng), *Bioresour Bioprocess*, vol. 8, no. 1, p. 65, 2021, doi: 10.1186/s40643-021-00419-w.
- [4] International Diabetes Federation, "IDF Diabetes Atlas," 10th ed, (in eng), Brussels, Belgium, Dec 2021, <https://diabetesatlas.org/data/en/>
- [5] World Health Organization, "The WHO Global Diabetes Compact," (in eng), Geneva, 2023, <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- [6] Ministerio de Salud de Costa Rica, "Alrededor de 20 personas han sido diagnosticadas diariamente con diabetes mellitus en 2023," (in spa), San José, Costa Rica, 2023, <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/prensa/60-noticias-2023/1710-alrededor-de-20-personas-han-sido-diagnosticadas-diariamente-con-diabetes-mellitus-en-el-2023#:~:text=Martes%2014%20de%20noviembre%2C%202023,con%20esta%20enfermedad%20por%20d%C3%ADa..>
- [7] A. Chawla, R. Chawla, and S. Jaggi, "Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum?," (in eng), *Indian J Endocrinol Metab*, vol. 20, no. 4, pp. 546-51, Jul-Aug 2016, doi: 10.4103/2230-8210.183480.
- [8] A. A. Lam, A. Lepe, S. H. Wild, and C. Jackson, "Diabetes comorbidities in low- and middle-income countries: An umbrella review," (in eng), *J Glob Health*, vol. 11, p. 04040, 2021, doi: 10.7189/jogh.11.04040.
- [9] A. M. Y. Zhang, E. A. Wellberg, J. L. Kopp, and J. D. Johnson, "Hyperinsulinemia in Obesity, Inflammation, and Cancer," (in eng), *Diabetes Metab J*, vol. 45, no. 3, pp. 285-311, May 2021, doi: 10.4093/dmj.2020.0250.
- [10] D. Tomic, J. E. Shaw, and D. J. Magliano, "The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus," (in eng), *Nat Rev Endocrinol*, vol. 18, no. 9, pp. 525-539, Sep 2022, doi: 10.1038/s41574-022-00690-7.
- [11] N. A. ElSayed *et al.*, "4. Comprehensive Medical Evaluation and Assessment of Comorbidities: Standards of Care in Diabetes-2023," (in eng), *Diabetes Care*, vol. 46, no. Suppl 1, pp. S49-s67, Jan 1 2023, doi: 10.2337/dc23-S004.
- [12] G. Akkus and M. Sert, "Diabetic foot ulcers: A devastating complication of diabetes mellitus continues non-stop in spite of new medical treatment modalities," (in eng), *World J Diabetes*, vol. 13, no. 12, pp. 1106-1121, Dec 15 2022, doi: 10.4239/wjd.v13.i12.1106.
- [13] G. Wilcox, "Insulin and insulin resistance," (in eng), *Clin Biochem Rev*, vol. 26, no. 2, pp. 19-39, May 2005.
- [14] A. Arunagiri *et al.*, "Proinsulin misfolding is an early event in the progression to type 2 diabetes," (in eng), *Elife*, vol. 8, Jun 11 2019, doi: 10.7554/eLife.44532.
- [15] S. Y. Park, J. F. Gautier, and S. Chon, "Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human," (in eng), *Diabetes Metab J*, vol. 45, no. 5, pp. 641-654, Sep 2021, doi: 10.4093/dmj.2021.0220.
- [16] D. F. Steiner, S. Y. Park, J. Støy, L. H. Philipson, and G. I. Bell, "A brief perspective on insulin production," (in eng), *Diabetes Obes Metab*, vol. 11 Suppl 4, pp. 189-96, Nov 2009, doi: 10.1111/j.1463-1326.2009.01106.x.
- [17] B. E. Corkey, J. T. Deeney, and M. J. Merrins, "What Regulates Basal Insulin Secretion and Causes Hyperinsulinemia?," (in eng), *Diabetes*, vol. 70, no. 10, pp. 2174-2182, Oct 2021, doi: 10.2337/dbi21-0009.

- [18] Fortune Business Insights, "Human Insulin Market Size, Share & Industry Analysis, By Type (Analogue Insulin and Traditional Human Insulin), By Diabetes Type (Diabetes 1 and Diabetes 2), By Distribution Channel (Hospital Pharmacy and Retail & Online Pharmacy), and Regional Forecast, 2024-2032," (in eng), Pune, India, Sep 8 2025, <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/human-insulin-market-100395>
- [19] N. A. Baeshen *et al.*, "Cell factories for insulin production," (in eng), *Microb Cell Fact*, vol. 13, p. 141, Oct 2 2014, doi: 10.1186/s12934-014-0141-0.
- [20] A. D. Wright, C. H. Walsh, M. G. Fitzgerald, and J. M. Malins, "Very pure porcine insulin in clinical practice," (in eng), *Br Med J*, vol. 1, no. 6155, pp. 25-7, Jan 6 1979, doi: 10.1136/bmj.1.6155.25.
- [21] J. Alyas, "Human Insulin: History, Recent Advances, and Expression Systems for Mass Production.," vol. 8, A. Rafiq, Amir, H., Khan, S., Sultana, T., Ali, A., Hameed, A., Ahmad, I., Kazmi, A., Sajid, T., & Ahmad, A., Ed., ed: Biomedical Research and Therapy, 2021, pp. 4540-4561. doi: 10.15419/bmrat.v8i9.692
- [22] P. Hazra *et al.*, "A novel peptide design aids in the expression and its simplified process of manufacturing of Insulin Glargine in *Pichia pastoris*," (in eng), *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 105, no. 8, pp. 3061-3074, Apr 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11224-y.
- [23] J. Szewczak, A. Bierczyńska-Krzysik, M. Piejko, P. Mak, and D. Stadnik, "Isolation and Characterization of Acetylated Derivative of Recombinant Insulin Lispro Produced in *Escherichia coli*," (in eng), *Pharm Res*, vol. 32, no. 7, pp. 2450-7, Jul 2015, doi: 10.1007/s11095-015-1637-y.
- [24] H. G. Hwang *et al.*, "Recombinant Glargine Insulin Production Process Using *Escherichia coli*," (in eng), *J Microbiol Biotechnol*, vol. 26, no. 10, pp. 1781-1789, Oct 28 2016, doi: 10.4014/jmb.1602.02053.
- [25] A. D. Riggs, "Making, Cloning, and the Expression of Human Insulin Genes in Bacteria: The Path to Humulin," (in eng), *Endocr Rev*, vol. 42, no. 3, pp. 374-380, May 25 2021, doi: 10.1210/endrev/bnaa029.
- [26] A. Beygmoradi, A. Homaei, R. Hemmati, and P. Fernandes, "Recombinant protein expression: Challenges in production and folding related matters," (in eng), *Int J Biol Macromol*, vol. 233, p. 123407, Apr 1 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123407.
- [27] M. R. Davey, P. Anthony, J. B. Power, and K. C. Lowe, "Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives," (in eng), *Biotechnol Adv*, vol. 23, no. 2, pp. 131-71, Mar 2005, doi: 10.1016/j.biotechadv.2004.09.008.
- [28] A. Berbec and T. Doroszevska, "The Use of *Nicotiana* Species in Tobacco Improvement.," *Springer International Publishing*, En N. V.Ivanov, N. Sierro, & M. C. Peitsch (Eds.), *The Genome*, pp. pp. 101-146, 2020, doi: 7/978-3-030-29493-9_8.
- [29] N. Selwal *et al.*, and phyto remediation capabilities of the tobacco plant: Advancements through genetic engineering and cultivation techniques," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 52, 2023, doi: 10.1016/j.bcab.2023.102845.
- [30] R. Tremblay, D. Wang, A. M. Jevnikar, and S. Ma, "Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins," (in eng), *Biotechnol Adv*, vol. 28, no. 2, pp. 214-21, Mar-Apr 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.11.008.
- [31] A. L. Demain and P. Vaishnav, "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms," (in eng), *Biotechnol Adv*, vol. 27, no. 3, pp. 297-306, May-Jun 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.
- [32] S. M. Rozov, A. A. Zagorskaya, Y. M. Konstantinov, and E. V. Deineko, "Three Parts of the Plant Genome: On the Way to Success in the Production of Recombinant Proteins," (in eng), *Plants (Basel)*, vol. 12, no. 1, Dec 21 2022, doi: 10.3390/plants12010038.
- [33] R. Bock, "Engineering Chloroplasts for High-Level Constitutive or Inducible Transgene Expression," (in eng), *Methods Mol Biol*, vol. 2317, pp. 77-94, 2021, doi: 10.1007/978-1-0716-1472-3_3.
- [34] M. Naeem, R. Han, N. Ahmad, W. Zhao, and L. Zhao, "Tobacco as green bioreactor for therapeutic protein production: latest breakthroughs and optimization strategies." *Plant Growth Regulation*, 103(2), 227-241. doi: 10.1007/s10725-023-01106-w
- [35] S. Bhorla, J. Yadav, H. Yadav, D. Chaudhary, R. Jaiwal, and P. K. Jaiwal, "Current advances and future prospects in production of recombinant insulin and other proteins to treat diabetes mellitus," (in eng), *Biotechnol Lett*, vol. 44, no. 5-6, pp. 643-669, Jun 2022, doi: 10.1007/s10529-022-03247-w.
- [36] J. M. Hamilton, D. J. Simpson, S. C. Hyman, B. K. Ndimba, and A. R. Slabas, "Ara12 subtilisin-like protease from *Arabidopsis thaliana*: purification, substrate specificity and tissue localization," (in eng), *Biochem J*, vol. 370, no. Pt 1, pp. 57-67, Feb 15 2003, doi: 10.1042/bj20021125.
- [37] C. Navarre, B. De Muyndck, G. Alves, D. Vertommen, B. Magy, and M. Boutry, "Identification, gene cloning and expression of serine proteases in the extracellular medium of *Nicotiana tabacum* cells," (in eng), *Plant Cell Rep*, vol. 31, no. 10, pp. 1959-68, Oct 2012, doi: 10.1007/s00299-012-1308-y.

- [38] D. C. Dixon, J. R. Cutt, and D. F. Klessig, "Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts," (in eng), *Embo j*, vol. 10, no. 6, pp. 1317-24, Jun 1991, doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb07650.x.
- [39] H. Daniell, "Transformation and foreign gene expression in plants by microprojectile bombardment," (in eng), *Methods Mol Biol*, vol. 62, pp. 463-89, 1997, doi: 10.1385/0-89603-480-1:463.
- [40] T. Murashige, "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures," vol. 15, F. Skoog, Ed., ed: *Physiol. Plant*, 1962, pp. 473-497.
- [41] S. Campos-Delgado, "Establecimiento de cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* L. Proyecto estudiantil Instituto Tecnológico de Costa Rica.," (in spa), Repositorio TEC, 2015, <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/6417>
- [42] A. Sahoo, P. K. Das, V. V. Dasu, and S. Patra, "Insulin evolution: A holistic view of recombinant production advancements," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 277, p. 133951, 2024/10/01/ 2024, doi: [10.1016/j.ijbiomac.2024.133951](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133951).
- [43] M. J. B. Burnett and A. C. Burnett, "Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities.# PLANTS, PEOPLE, PLANET, 2(2), 121-132. doi: 10.1002/ppp3.10073
- [44] W. H. Brondyk, "Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein," (in eng), *Methods Enzymol*, vol. 463, pp. 131-47, 2009, doi: 10.1016/s0076-6879(09)63011-1.
- [45] C. H. Schein, "Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria." *Bio/Technology*, 7(11), 1141-1149. <https://doi.org/10.1038/nbt1189-1141>
- [46] S. Schillberg, N. Raven, H. Spiegel, S. Rasche, and M. Buntru, "Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins," (in eng), *Front Plant Sci*, vol. 10, p. 720, 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.00720.
- [47] A. Jayakrishnan et al., "Evolving Paradigms of Recombinant Protein Production in Pharmaceutical Industry: A Rigorous Review." *Sci*, 6(1), Article 1. doi: 10.3390/sci6010009
- [48] M. Zieliński et al., "Expression and purification of recombinant human insulin from *E. coli* 20 strain," (in eng), *Protein Expr Purif*, vol. 157, pp. 63-69, May 2019, doi: 10.1016/j.pep.2019.02.002.
- [49] Y.-S. Chen, J. L. Zaro, D. Zhang, N. Huang, A. Simon, and W.-C. Shen, "Characterization and Oral Delivery of Proinsulin-Transferrin Fusion Protein Expressed Using ExpressTec," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 2, doi: 10.3390/ijms19020378.
- [50] Z. Ling et al., "Transgenic Expression and Identification of Recombinant Human Proinsulin in Peanut," *Braz. arch. biol. technol.*, vol. 59, 2016, doi: 10.1590/1678-4324-2016150131.
- [51] P. Maliga, T. Tungsuchat-Huang, and K. A. Lutz, "Transformation of the Plastid Genome in Tobacco: The Model System for Chloroplast Genome Engineering," (in eng), *Methods Mol Biol*, vol. 2317, pp. 135-153, 2021, doi: 10.1007/978-1-0716-1472-3_6.
- [52] D. Boyhan and H. Daniell, "Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide," (in eng), *Plant Biotechnol J*, vol. 9, no. 5, pp. 585-98, Jun 2011. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00582.x
- [53] N. Rajkumari, S. Alex, K. B. Soni, K. N. Anith, M. M. Viji, and A. G. Kiran, "Silver nanoparticles for biolistic transformation in *Nicotiana tabacum* L.," (in eng), *3 Biotech*, vol. 11, no. 12, p. 497, Dec 2021.
- [54] S. A. Olejniczak, E. Łojewska, T. Kowalczyk, and T. Sakowicz, "Chloroplasts: state of research and practical applications of plastome sequencing," (in eng), *Planta*, vol. 244, no. 3, pp. 517-27, Sep 2016, doi: 10.1007/s00425-016-2551-1.
- [55] Z. Duan et al., "Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Protein Homeostasis in Plants," (in eng), *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 24, Dec 18 2023, doi: 10.3390/ijms242417599.
- [56] A. Fernández-San Millán et al., "Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic," in *Plant Biotechnol J*, vol. 6, no. 5). England, 2008, pp. 427-41. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00338.x>
- [57] I. Farran, I. McCarthy-Suárez, F. Río-Manterola, C. Mansilla, J. J. Lasarte, and A. M. Mingo-Castel, "The vaccine adjuvant extra domain A from fibronectin retains its proinflammatory properties when expressed in tobacco chloroplasts," (in eng), *Planta*, vol. 231, no. 4, pp. 977-90, Mar 2010, doi: 10.1007/s00425-010-1102-4.
- [58] P. Maliga, "Plastid transformation in higher plants," (in eng), *Annu Rev Plant Biol*, vol. 55, pp. 289-313, 2004, doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141633.

- [59] S. Schillberg, N. Raven, R. Fischer, R. M. Twyman, and A. Schiermeyer, "Molecular farming of pharmaceutical proteins using plant suspension cell and tissue cultures," (in eng), *Curr Pharm Des*, vol. 19, no. 31, pp. 5531-42, 2013, doi: 10.2174/1381612811319310008.
- [60] J. Denecke, J. Botterman, and R. Deblaere, "Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway," (in eng), *Plant Cell*, vol. 2, no. 1, pp. 51-9, Jan 1990, doi: 10.1105/tpc.2.1.51.
- [61] A. Gnanasambandam and R. G. Birch, "Efficient developmental mis-targeting by the sporamin NTPP vacuolar signal to plastids in young leaves of sugarcane and Arabidopsis," (in eng), *Plant Cell Rep*, vol. 23, no. 7, pp. 435-47, Dec 2004, doi: 10.1007/s00299-004-0860-5.
- [62] Z. Svab and P. Maliga, "High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, no. 3, pp. 913-7, Feb 1 1993, doi: 10.1073/pnas.90.3.913.
- [63] N. V. Romadanova, A. B. Tolegen, S. V. Kushnarenko, E. V. Zhodybayeva, and J. C. Bettoni, "Effect of Plant Preservative Mixture(TM) on Endophytic Bacteria Eradication from In Vitro-Grown Apple Shoots," (in eng), *Plants (Basel)*, vol. 11, no. 19, Oct 5 2022.
- [64] P. Doran, "Foreign protein production in plant tissue cultures"(in eng), *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 11, no. 2, pp. 199-204, Apr 11 2000, doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00086-0.
- [65] J. K. Bharathi, P. Suresh, M. A. Samy Prakash, S. Muneer, "Exploring recent progress of molecular farming for therapeutic and recombinant molecules in plant systems" (in eng), *Heliyon*, vol. 10, no. 18, pp. 199-204, Sep 2024, doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37634.
- [66] J. Pei, B. Wang, and D. Wang, "Current Studies on Molecular Mechanisms of Insulin Resistance," (in eng), *J Diabetes Res*, vol. 2022, p. 1863429, 2022, doi: 10.1155/2022/1863429.
- [67] X. Zhao, X. An, C. Yang, W. Sun, H. Ji, and F. Lian, "The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease," (in eng), *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 14, p. 1149239, 2023, doi: 10.3389/fendo.2023.1149239.
- [68] C. R. Kahn and M. F. White, "The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 82, no. 4, pp. 1151-6, Oct 1988. doi: 10.1172/JCI113711.
- [69] Le, T. K. C., Dao, X. D., Nguyen, D. V., Luu, D. H., Bui, T. M. H., Le, T. H., Nguyen, H. T., Le, T. N., Hosaka, T., & Nguyen, T. T. T. (2023). Insulin signaling and its application. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1226655>
- [70] Peng, J., & He, L. (2018). IRS Posttranslational Modifications in Regulating Insulin Signaling. *Journal of molecular endocrinology*, 60(1), R1-R8. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0151>
- [71] Yunn, N.-O., Kim, J., Ryu, S. H., & Cho, Y. (2023). A stepwise activation model for the insulin receptor. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(10), 2147-2161. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01101-1>
- [72] Pei, J., Wang, B., & Wang, D. (2022). Current Studies on Molecular Mechanisms of Insulin Resistance. *Journal of Diabetes Research*, 2022, 1863429. <https://doi.org/10.1155/2022/1863429>
- [73] Zhao, X., An, X., Yang, C., Sun, W., Ji, H., & Lian, F. (2023). The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1149239. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1149239>
- [74] Choi, E., & Bai, X. (2023). Activation mechanism of the insulin receptor: A structural perspective. *Annual review of biochemistry*, 92, 247-272. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052521-033250>

Material suplementario

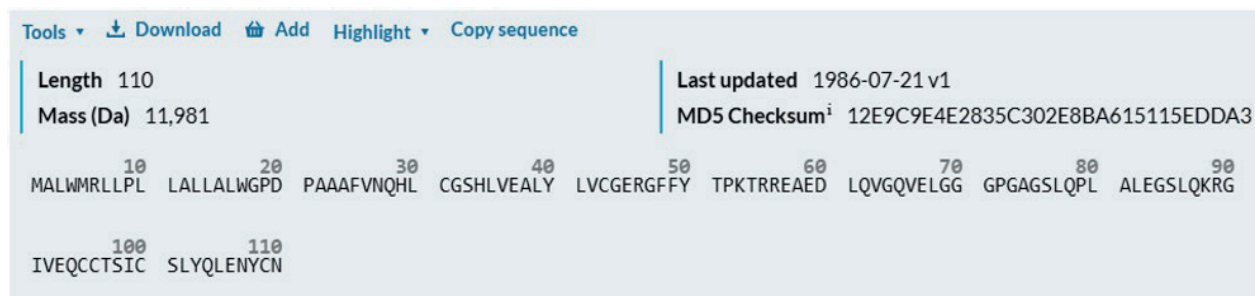


Figura S1. Secuencia de aminoácidos del gen de insulina A humana. Obtenida de <https://www.uniprot.org/>, accesado en febrero 2020.

Nucleotide Sequence (333 nt):

ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCAGCCGCAG
CCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAGCTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGG
CTTCTTCTACACACCAAGACCCGCCGGGAGGCAGAGGACCTGCAGGTGGGGCAGGTGGAGCTGGGCGGG
GGCCCTGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTGGCCCTGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAAC
AATGCTGTACCAGCATCTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG

Translation (110 aa):

MALWMRLLPLLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGG
GPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSI CSLYQLENYCN

Figura S2. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la proteína insulina humana. Obtenidos de la base de datos CCDS.

Results ORDER 1 ITEM

MANUAL OPTIMIZATION

ATG GCT TTG TGG ATG AGA TTA CTG CCA CTT CTC GCA CTT CTG GCA TTA TGG GGT CCT GAT CCA GCA GCA GCA TTT GTC AAC CAA
CAT CTG TGT GGA AGC CAC CTC GTA GAA GCC TTG TAC TTA GTC TGT GGT GAG AGA GGG TTC TTT TAC ACT CCC AAG ACT CGT CGA
GAG GCC GAG GAT TTG CAG GTG GGT CAA GTC GAA CTT GGA GGC GGA CCC GGA GCA GGC TCC TTG CAA CCC TTA GCC CTT GAA GGG
TCC TTG CAG AAA AGG GGG ATT GTC GAA CAG TGC TGC ACT AGC ATC TGC AGT CTC TAT CAA TTA GAG AAC TAC TGT AAC TAG

Sequence passes initial screening.

Figura S3. Secuencia de nucleótidos de insulina humana optimizada mediante la herramienta Codon Optimization Tool (IDT,USA).

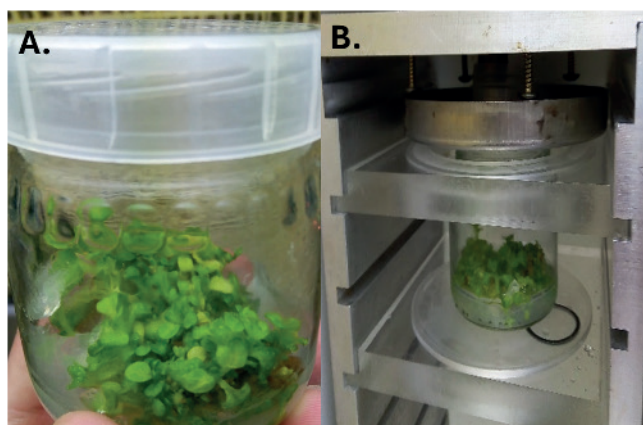


Figura S4. Transformación genética de plantas de tabaco (*N. tabacum*). A. Material vegetal empleado previo a bombardeo. B. Sistema de biobalística ensamblado para bombardeo dentro de cámara de flujo laminar. Laboratorio de Biotecnología de Plantas del ITCR, San Carlos.

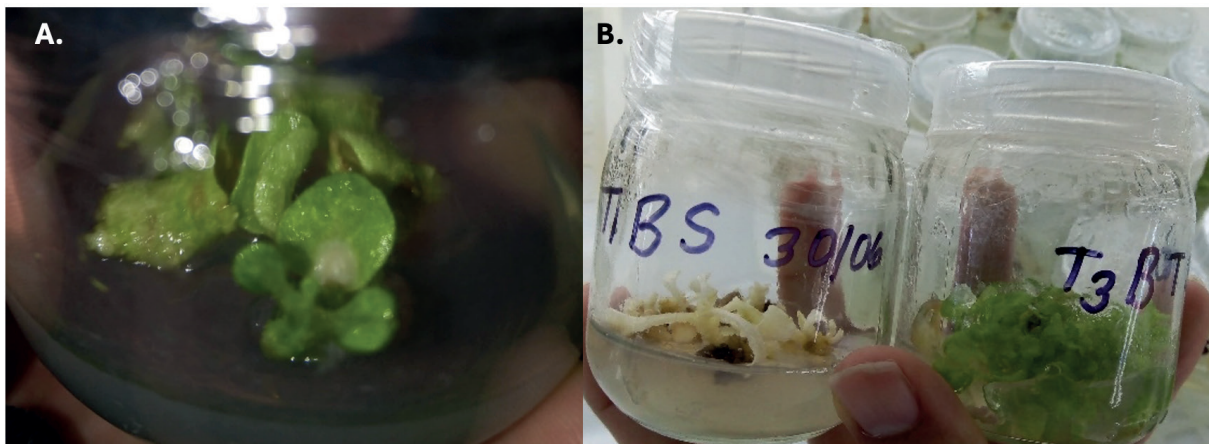


Figura S5. Control de la transformación genética de tabaco (*N. tabacum*) con los genes de insulina. A. Material vegetal subcultivado 15 días después de bombardeo con el ADN transformante, en medio RMOP con espectinomicina. B. Material vegetal no transformado, en medio RMOP con espectinomicina y material vegetal en medio RMOP sin antibiótico. Condiciones de crecimiento de 25°C e intensidad lumínica de 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ por 16h. Laboratorio de Biotecnología de Plantas del ITCR, San Carlos.

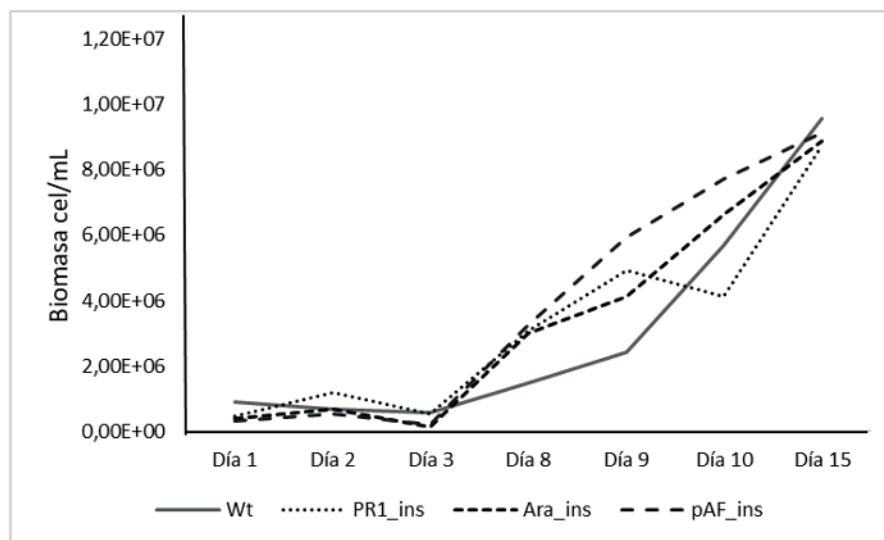


Figura S6. Curvas de crecimiento de las suspensiones celulares a partir de callo de *N. tabacum* in vitro a partir de explantes de hoja, incubado en condiciones de oscuridad, con un medio MS completo, a partir del día 15 se presentó contaminación y muerte celular. Centro de Investigación en Biotecnología. ITCR, Cartago.

Declaración sobre uso de Inteligencia Artificial (IA)

Los autores aquí firmantes declaramos que no se utilizó ninguna herramienta de IA para la conceptualización, traducción o redacción de este artículo.