

Universidad Juan Agustín Maza

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Carrera Bioquímica



MONOGRAFÍA

“Síntesis de insulina humana en *Arabidopsis thaliana* recombinante”

Docentes

Quintero, C., Pelegrina, L.

Autores

Olivera, T., Quiroga A., Suárez F.

Curso

Biología

Mendoza, Argentina

2021

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
DESARROLLO	2
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
2.2.1 Aislamiento del gen	3
2.2.2 Inserción del plásmido	3
2.2.3 Transfección	3
2.2.4 Infección	3
CONCLUSIÓN	5
BIBLIOGRAFÍA	5

RESUMEN

La insulina humana es una hormona polipeptídica producida en las células beta de los Islotes de Langerhans pancreáticos. Su principal función es glucoreguladora y la deficiencia de la producción de la misma produce diabetes. Estadísticamente el número de personas afectadas va en aumento, por lo que es indispensable desarrollar tecnologías para la producción de insulina funcional a gran escala y bajo costo. Inicialmente se purificaba insulina en el páncreas de porcinos y bovinos, luego se produjo en una gran variedad de organismos, como bacterias, levaduras y cultivos celulares mamíferos. En esta revisión de artículos se evalúa la síntesis en plantas transgénicas y sus beneficios. Se utiliza *Arabidopsis thaliana*, por ser simple de mantener en un laboratorio, de fácil cultivo y poseer su genoma completamente secuenciado. Se aísla un plásmido de *Agrobacterium*

tumefaciens y se insertan los genes que codifican para la síntesis de ambas cadenas de la hormona mediante enzimas de restricción, luego se transfecta la bacteria con el plásmido recombinante y se utiliza el método de inmersión de flores para infectar a la planta. Esta planta recombinante es capaz de sintetizar la hormona en las semillas, con un alto nivel de similitud respecto a la estándar. Cada planta produce alrededor de 20.000 semillas y la insulina puede ser almacenada en estas por largos períodos de tiempo. Esta tecnología resulta prometedora, es importante continuar su desarrollo en plantas, por ser eficiente y económica.

Palabras clave: Insulina humana, síntesis, *Arabidopsis thaliana*

1. INTRODUCCIÓN

La insulina es una hormona polipeptídica, formada por 51,5

aminoácidos, con una estructura molecular en forma de pentágono. Se produce en las células beta de los Islotes de Langerhans pancreáticos en forma de proinsulina unida al péptido C (forma inactiva) . Su principal función es glucorreguladora. ^[1]

En caso de que se produzca una deficiencia en la producción de la misma, sea absoluta o relativa, se da la diabetes. Esta enfermedad está ligada a elevados niveles de glucosa en sangre, que conduce a graves daños en sistema circulatorio, ojos, riñones y nervios. ^[2] Estadísticamente el número de personas afectadas va en aumento y para 2030 se estima que más de 360 millones de personas padecerán diabetes a nivel mundial. ^[3]

Por lo anteriormente expuesto surgió la necesidad de desarrollar tecnologías para la producción de insulina. Inicialmente se purificaba insulina en el páncreas de porcinos y bovinos. Más recientemente se utiliza tecnología recombinante. ^[4]

La insulina humana recombinante se ha expresado en una gran variedad de organismos, como bacterias, levaduras (principalmente *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*) y cultivos celulares mamíferos. ^[4-5]

La hipótesis planteada es si esta proteína recombinante puede ser sintetizada en plantas transgénicas, y qué beneficios tendría la producción en las mismas.

2. DESARROLLO

Luego de una revisión bibliográfica se determinó que los estudios

desarrollados en la materia abordada se han concluido en la planta *Arabidopsis thaliana*, esto dado a que fue la primera planta en ser secuenciada y otras características que abordaremos posteriormente.

La tecnología de producción basada en plantas, implica la selección de orgánulos subcelulares, denominados cuerpos oleosos y permite obtener altos niveles de expresión y recuperación rentable de insulina recombinante. Además ofrecen el potencial para una producción segura, económica y en masa de insulina. ^[5]

2.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una pequeña planta de rápido crecimiento y fácil de mantener en el laboratorio. Fue la primera planta cuyo genoma se secuenció, en 1997. Su pequeño genoma ($2n=10$) y su corto ciclo vital le dan un gran potencial para la experimentación genética. Además, cada planta es capaz de producir entre 10.000 y 30.000 semillas. ^[6]

Con experimentación reciente, el gen de la insulina humana se ha expresado con éxito en semillas oleaginosas de la planta *Arabidopsis thaliana*. ^[7] La ventaja de trabajar con plantas transgénicas es que son de bajo costo, alta calidad proteica, no tienen patógenos humanos y debido a que son eucariotas, su maquinaria es más similar a la de los humanos. ^[6] La insulina derivada de plantas se acumula a niveles significativos en la semilla transgénica (0.13% de proteína de semilla total). ^[6]

2.2 Procedimiento

2.2.1 Aislamiento del gen

Se obtiene el ADN complementario (ADNc) a partir de ARNm para las cadenas A y B de la insulina humana, utilizando una transcriptasa reversa. Ambas cadenas de ADNc son amplificadas por PCR.^[6]

2.2.2 Inserción del plásmido

Se aísla el plásmido de *Agrobacterium tumefaciens* y se corta utilizando enzimas de restricción para insertar la secuencia de ADNc de la cadena A y la cadena B por separado. Se añaden

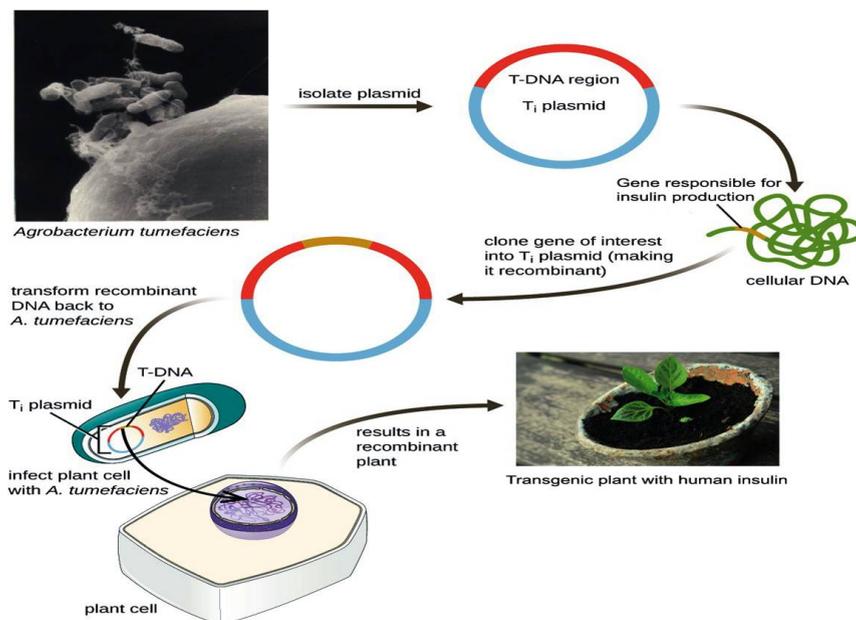
ligasas para unir el gen de la cadena insertado en el plásmido.

2.2.3 Transfección

La entrada de plásmidos recombinantes en las células se denomina transfección. Se pueden utilizar diferentes técnicas, como el tratamiento con CaCl₂ o las técnicas de electroporación. Tras la entrada del plásmido, las células se transforman.

2.2.4 Infección

Agrobacterium recombinante se emplea para transformar *A. thaliana* mediante el método de inmersión de flores.^[5-6]



Human Insulin: History, Recent Advances, and Expression Systems for Mass Production. Mecanismo involucrado en el desarrollo de plantas transgénicas mediadas por *Agrobacterium* para la producción de insulina humana.

Las plantas- transformadas y no transformadas- se dejan crecer hasta la madurez y se recogen sus semillas. Estas se esterilizan con un lavado rápido de 70% de etanol, luego con lejía al 20% y finalmente con agua bidestilada.

Paso seguido, las semillas se colocan en una placa de media fuerza MS (Murashige y Skoog ^[5], con agar al 0,6 %; 0,3% de sacarosa y fosfotricina herbicida. Después del establecimiento de las raíces, las plántulas transgénicas putativas se

transfieren individualmente a macetas y se dejan crecer hasta la madurez. Es recomendable cubrir las con una cúpula plástica transparente para proteger las plántulas sensibles. A continuación, las semillas positivas se cultivan durante otra generación para generar semillas T 3 y se analizan. [6]

Por otro lado, para evaluar la expresión de la proteína en plantas transgénicas se debe emplear una electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio reductor (SDS-PAGE).

2.3 Extracción de la insulina de las semillas y posterior análisis.

Los cuerpos oleosos que retienen la insulina, por esta característica pueden dividirse del resto de los componentes de la semilla por separación de fases líquido-líquido. Este proceso suave elimina la necesidad de replegar y puede reducir

el número de pasos de cromatografía necesarios para obtener un producto purificado, reduciendo así significativamente el costo total de los productos. [5]

La insulina recombinante, purificada del resto del cuerpo oleoso y aislada del socio de fusión de oleosina se debe madurar in vitro con tripsina. Luego se puede emplear una cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) para comparar la insulina obtenida respecto al pico estándar de insulina. En una de las investigaciones a las que se recurrió para la realización de este trabajo se analizó por la metodología antes dicha y se concluyó que el pico de retención es casi idéntico al estándar de insulina. En este estudio se ensayó tanto con cuerpos oleosos de plantas modificadas, como de no modificadas, concluyendo que no se resuelve ningún pico en las últimas. [5]

Tabla 2. Elución de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) y análisis espectral de masas posterior del estándar de insulina humana (hIN) en comparación con la oleosina-insulina humana (OB-hIN) escindida con tripsina, recolectada de 17.0 a 17.5 min. una columna C18

Insulina	Muestra	Retención de RP-HPLC (min)	Masa esperada (Da)	Masa observada (Da)
estándar hIN (Sigma)	hIN	17.213	5807.6	5807.6
Insulina madurada con tripsina OB-hIN	DesB ₃₀ de origen vegetal -insulina	17.269	5706,5	5706,3

[Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from Arabidopsis thaliana seeds](#)

También se puede emplear para el análisis espectral de masa. Pudiendo analizar la insulina desarrollada en comparación con la insulina humana.

3. CONCLUSIÓN

Luego de la revisión de artículos científicos, se concluye que es posible

la síntesis de insulina humana por medio de plantas transgénicas. En este caso en particular nos enfocamos en la planta *Arabidopsis thaliana*, por sus características de ser simple de mantener en un laboratorio, de fácil cultivo y poseer su genoma completamente secuenciado.

No es un hecho menor poder sintetizar esta hormona en una planta, esto dado a que es un organismo eucariota, al igual que los seres humanos, no son patógenas para los hombres y además tienen bajo costo de mantenimiento.

En los estudios analizados se obtuvieron buenos resultados, siendo la insulina sintetizada muy similar a la estándar, por lo que resulta prometedora esta tecnología. Otro punto a favor es que la insulina puede ser almacenada en las semillas (constituyendo el 0,13% de cada una) por largos períodos de tiempo y que cada planta produce alrededor de 20.000 semillas.

Si bien actualmente la tecnología que se emplea para la síntesis de insulina tiene como soporte a *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* principalmente, es importante continuar desarrollando esta tecnología en plantas, por ser eficiente y económica.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Oñate MLC. CONCEPTO DE INSULINA Y ACCIÓN [Internet]. Chospab.es. [citado octubre de 2021]. Disponible en:

https://www.chospab.es/cursos_on_line/insulino/pagina_09.htm

2. Diabetes [Internet]. PAHO. [citado octubre de 2021]. Disponible en:

<https://www.paho.org/es/temas/diabetes>

3. Slimel MR, Coppolillo FE, Masi JD, Mendoza SM, Tannuri J. Epidemiología de la diabetes en Argentina. Av diabetol. 2010;26(2):101–6.

4. Soto Pol VR, Hernandez Guzman J, Morales Hernandez Y, Dios de la Cruz O. Producción de insulina a partir de organismos bacterianos: Revisión bibliográfica para la técnica molecular. KUXULKA [Internet]. 2008 [citado octubre de 2021];14(27):29–34. Disponible en: <http://ri.ujat.mx/bitstream/20.500.12107/2434/1/-847-710-A.pdf>

5. Nykiforuk CL, Boothe JG, Murray EW, Keon RG, Goren HJ, Markley NA, et al. Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. Plant Biotechnol J. 2006;4(1):77–85.

6. Alyas E, Rafiq A, Amir H, Khan SU, Sultana T, Ali A, et al. Human insulin: History, recent advances, and expression systems for mass production. Biomed Res Ther. 2021;8(9):4540–61.

7. Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MMM, Ramadan HAI, et al. Cell factories for insulin production. Microb Cell Fact. 2014;13(1):141.