

PLANTAS COMO FÁBRICAS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES HUMANAS

Dora Janeth García J*

Resumen

Las plantas han sido empleadas por cientos de años para propósitos medicinales. Actualmente la biotecnología vegetal se ha expandido masivamente, el desarrollo de herramientas de ingeniería genética, biología molecular, cultivo de tejidos y técnicas de fermentación han permitido el crecimiento de las células y microorganismos bajo condiciones controladas, dando origen a la producción de materiales de alto potencial clínico e industrial. "Plant molecular farming" es una nueva rama de la biotecnología donde las plantas, por medio de la ingeniería genética, son modificadas para producir proteínas terapéuticas como vacunas, citocinas, anticuerpos, factores de crecimiento y enzimas disminuyendo riesgos de contaminación, tiempos y costos de producción.

Palabras clave: *Biotecnología, proteínas recombinantes, plantas transgénicas, ingeniería genética, Agrobacterium tumefaciens.*

Artículo recibido: noviembre 15 de 2010 **aprobado:** diciembre 9 de 2010

PLANT MOLECULAR FARMING

Abstract

Plants have been used for centuries for medical purposes. Currently, plant biotechnology has expanded the development of genetic engineering tools, molecular biology, tissue culture and fermentation techniques have allowed the growth of cells and organisms under controlled conditions, enabling the production of materials for clinical and industrial potential. "Plant molecular farming" is a new branch of biotechnology where the plants through genetic engineering are modified to produce therapeutic proteins such as vaccines, cytokines, antibodies, growth factors and enzymes while reducing contamination risks, time and productions costs.

Keywords: *Biotechnology, recombinants proteins, transgenic plants, plant molecular farming, genetic engineer, Agrobacterium tumefaciens.*

* Licenciada en Biología y Química. Candidata a magister en biología molecular y biotecnología. Junior Specialist in Plant Transformation Research Center –PTRC-. Universidad de California Riverside. Correo Electrónico: dorag@ucr.edu

Introducción

La tecnología del ADN recombinante y la generación de organismos genéticamente modificados hicieron posible la expresión de proteínas humanas de amplio valor farmacéutico como vacunas y anticuerpos en plantas. Éstas son conocidas como proteínas recombinantes.

Las plantas pueden ser usadas como biorreactores para la producción de diversas proteínas. Durante varias décadas diversos sistemas de expresión han sido empleados para la producción de proteínas recombinantes incluyendo levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismos como *Escherichia coli*, algas, células y animales transgénicos (especialmente de insectos). Sin embargo, las plantas son un buen modelo gracias a sus bajos costos, estabilidad de la proteína, tiempos de producción, fácil escalamiento y obtención del producto recombinante.

La producción de proteínas recombinantes implica el uso de la biotecnología a diversos niveles, incluyendo métodos de transformación, control de expresión genética, expresión en diversas plataformas, selección de la proteína a expresar, su acumulación, mantenimiento y estabilidad. Todo esto hace parte de una nueva rama de la biotecnología conocida como "*Plant molecular farming*."²⁹

Durante muchos siglos las plantas nos han proporcionado un sinnúmero de moléculas con aplicaciones médicas e industriales. Pero, solo a partir de los años 80, con la producción de las primeras plantas de tabaco transgénicas se forjaron los inicios de la tecnología del ADN recombinante⁴ dando vía a la producción en 1986 y 1989 de la hormona

de crecimiento humana y el primer anticuerpo en plantas transgénicas de tabaco, respectivamente.^{2,12} Estos resultados mostraron que las plantas pueden ensamblar varios complejos multiprotéicos funcionales, manteniendo su autenticidad estructural. En 1997 se produjo la primera proteína de alto valor comercial, la avidina, expresada en maíz transgénico¹³. Desde entonces las ventajas y posibilidades de la tecnología han brindado nuevas oportunidades para la producción de un sinnúmero de compuestos de importancia clínica e industrial.²⁹

Una planta transgénica ha sido modificada genéticamente con la incorporación en su genoma del gen foráneo que codifica una proteína específica (por ejemplo, el gen que codifique el colágeno) bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. Este gen producirá el colágeno que posteriormente será aislado de un órgano específico de la planta. Actualmente se generan plantas genéticamente modificadas no solo para uso en alimentación (como incrementando su contenido nutricional en vitaminas o minerales) sino también para la producción de otros compuestos como proteínas o diversos metabolitos de uso farmacéutico y/o industrial con potencial comercial como enzimas, anticuerpos, vacunas, hormonas, proteínas sanguíneas como albuminas, citocinas, diversas moléculas de señalización, suplementos nutricionales y nuevos polímeros de interés clínico e industrial.²³

El conocimiento, relativa facilidad y eficiencia de transformación, la disminución de riesgos de contaminación ambiental por flujo genético y fácil escalamiento hacen que plantas como

tabaco, arroz, soya, trigo, canola y cebada sean las principales plataformas empleadas para la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, otros sistemas vegetales como papa, zanahoria, lechuga, alfalfa, *arabidopsis* y frijol también han sido empleados para expresión de proteínas heterólogas.^{1,21} En esta revisión se muestran algunos aspectos para la generación de plantas transgénicas, plataformas de expresión de proteínas recombinantes y algunos productos de interés médico expresados en plantas, que actualmente se encuentran en fase experimental o en mercadeo.

Transformación genética en plantas

La ingeniería genética es una herramienta empleada para la introducción de genes foráneos (que pueden ser de la misma o diferente especie) en las plantas y que les proporcionan ventajas como la resistencia a insectos, a enfermedades virales, fúngicas o bacterianas, tolerancia a herbicidas, plantas resistentes a condiciones extremas como alcalinidad, salinidad, sequía, y frío. Actualmente la transgénesis en plantas tiene amplias aplicaciones, entre las cuales se destacan el uso de plantas como sensores de genotoxicidad, polución ambiental y como biorreactores empleadas para la producción de moléculas biológicas como anticuerpos y vacunas. La transgénesis también es empleada en investigación para identificar claramente aspectos moleculares, fisiológicos, genéticos y bioquímicos de las plantas. La transformación genética se basa en la introducción de ADN en el interior de células vegetales, para ello se requiere un vector plasmídico en el cual se insertó

el gen de interés, luego, este constructo genético debe ser incorporado en el genoma de la planta y finalmente las células totipotentes (presentes también en tejidos vegetales) que tienen la capacidad de dividirse y regenerar una nueva plántula que expresará la o las características de interés. (figura1) Para llevar a cabo una exitosa transformación genética es importante considerar; el constructo genético, el vector plasmídico, el tipo de promotor, el índice de adaptación del codón, un eficiente método para la introducción del ADN en el genoma de las células vegetales y un buen sistema de regeneración vegetal que permita la obtención de nuevas plantas transgénicas^{1, 22, 27, 29.}

La transgénesis puede ser estable o transiente. La transformación genética estable es aquella en la cual la incorporación del gen foráneo o de interés se da en el genoma nuclear de la planta y esta información será heredada a las siguientes progenies. Solo después de varias generaciones se obtienen las plantas homocigotas para el gen de interés. La transferencia del ADN a las células receptoras fue un proceso que se inició en los años 60, pero solo años después y gracias a acontecimientos como el conocimiento del mecanismo de formación de la agalla en plantas por *Agrobacterium tumefaciens* (bacteria Gram negativa, patógeno vegetal, capaz de introducir ADN en las células vegetales de forma natural),¹⁰ el descubrimiento del mecanismo molecular para la transferencia del T-DNA al genoma de la planta y el clonaje de genes permitieron el desarrollo de la ingeniería genética vegetal.

Estos hechos abrieron la posibilidad de inducir nuevos y diversos segmentos de ADN (que codifican una proteína específica) en el interior de las células vegetales generando en 1983 las primeras plantas de tabaco transgénicas.⁴ Actualmente, la transformación genética mediada por *Agrobacterium* es empleada en un amplio rango de especies vegetales como mecanismo de transformación estable y transiente. La transformación de protoplastos usando polietilenglicol o micro-inyección y bombardeo de partículas son otros métodos alternativos desarrollados que también son empleados dependiendo el objetivo de la transformación.³⁷

Aunque su eficiencia es menor, la transformación de plastidios es un método que ha sido considerado como una estrategia alternativa a la transformación nuclear. Los plastidios son organelas celulares que contienen ADN, razón por la cual puede llevarse a cabo la incorporación de un transgen para la producción de proteínas recombinantes específicas. Los plastidios han sido considerados biocontenedores naturales de un transgen, son espacios estables e ideales para expresar altos niveles de la proteína en su interior³⁰. La selección de plantas homoplastómicas (cada cloroplasto lleva el transgen) se logra después de varias generaciones a partir de la regeneración de explantes de hojas bombardeadas, que tienen la capacidad de diferenciarse y crecer en el medio de selección. La biobalística es el método empleado para la transformación de organelas celulares como los plastidios. El método involucra el bombardeo de células vegetales con partículas de ADN microscópicas recubiertas de oro.³⁷

Los sistemas de transformación transiente, son amplia y rutinariamente utilizados para la validación rápida de los constructos de expresión. Dentro de los métodos de expresión transiente se tiene: 1. Agroinfiltración; este método desarrollado por Kapila¹⁵ consiste en la infiltración de una solución de *Agrobacterium tumefaciens* (contiene en el T-DNA el gen de interés) en el interior de las células de hojas de tabaco, facilitando la transferencia del T-DNA a las células. 2. Infección viral; este método se basa en la habilidad de virus vegetales para infectar una planta. Virus como el mosaico del tabaco (TMV) y el virus X de la papa (PVX) han sido usados como vectores para la transferencia de genes foráneos al interior de la planta. El uso de este sistema de expresión implica el procesamiento rápido de la proteína recombinante para evitar degradación.

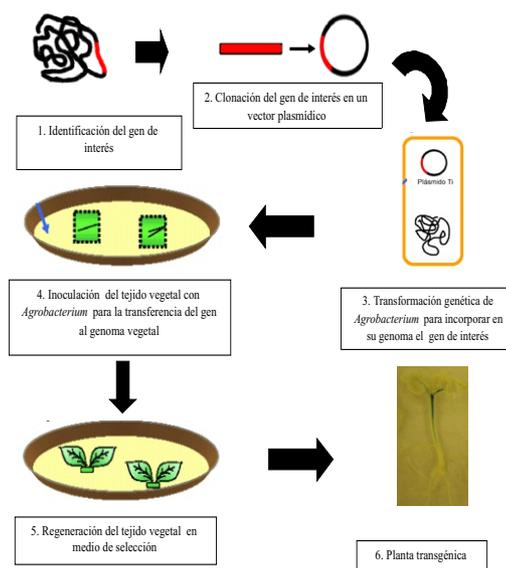


Figura 1. Esquema general para la generación de plantas transgénicas.²⁶ Imagen número 6: planta transgénica expresando GUS (β -glucuronidasa). Gen reportero empleado ampliamente en biología molecular para la localización de un transgen.

La producción de proteínas recombinantes requiere un sistema de expresión estable del transgen, ya que

el método se basa en la acumulación de la proteína de interés en diferentes organelas vegetales, por ejemplo hojas, semillas, frutos, raíces, plastidios. La localización depende del sistema de expresión, y la proteína de interés.²⁹

Sistemas vegetales para la producción de proteínas recombinantes

Como eucariotes superiores, la presencia de sistemas de glicosilación y mecanismos pos-traduccionales de las plantas, permiten la síntesis de péptidos pequeños, polipéptidos y complejos multiprotéicos funcionales. Además, las células vegetales presentan chaperonas (proteínas que ayudan a otras proteínas en su plegamiento, ensamble y movilidad dentro de la célula) homólogas a las presentes en células humanas facilitando la producción, ensamble y mantenimiento de la proteína y, con ello, facilitando que una gran diversidad de biomoléculas puedan ser potencialmente producidas en sistemas vegetales.²³

Características como la disminución de los riesgos de contaminación por patógenos humanos, practicidad, disminución de costos y tiempos de producción hacen que las plantas se consideren como invaluable y convenientes sistemas para la producción a gran escala de múltiples proteínas recombinantes. Factores como la cantidad de biomasa, la producción de proteína recombinante por hectárea, facilidad para la transformación y escalado son considerados en el momento de seleccionar la plataforma para la expresión de una proteína recombinante.³⁷

Actualmente las semillas de algunos cereales como maíz, arroz, cebada y trigo son consideradas como buenos órganos para la acumulación de proteínas recombinantes. Estas pueden ser almacenadas por largos periodos y gracias a la ausencia de compuestos fenólicos puede mantener la estabilidad de la proteína. Además, la extracción del producto final a partir de semillas es fácil; en algunas ocasiones se han hecho fusiones de la proteína de interés a moléculas oleosas que se asocian a membranas permitiendo su rápida separación del sistema vegetal. Y una de las principales ventajas de las semillas es que la vacuna, antígeno o proteína farmacéutica sea suministrada de forma oral para ser usadas como proteínas para inmunización, inmunoterapia y tratamiento de enfermedades.²⁹

Suspensiones celulares

El cultivo de células vegetales en suspensión es una alternativa para la producción de proteínas recombinantes. Este sistema requiere condiciones in vitro estériles, manejo de nutrientes y de los sistemas de aireación para la producción de la proteína de interés. Una de las principales ventajas en el uso de este sistema de expresión es la reducción de la heterogeneidad de la proteína debido a la uniformidad en tamaño y tipo de células empleadas.^{21, 9} Además, es considerado un sistema rápido ya que no implica la regeneración y caracterización de la planta transgénica, los costos no son elevados, es un método seguro y las líneas celulares productivas pueden ser generadas en pocos meses permitiendo su escalado. Sin embargo, la disminución en la producción de la proteína en la

fase estacionaria debido al incremento de actividad proteolítica y la existencia de pocas líneas celulares caracterizadas son limitantes para esta plataforma de producción. La vacuna contra la enfermedad de Newcastle para pollos es un ejemplo de producto recombinante expresado en células en suspensión.²⁹

Proteínas recombinantes producidas en plantas

Algunos productos recombinantes expresados en plantas se muestran en la tabla 1.

Vacunas

Una vacuna es una preparación antigénica que al ser aplicada en un organismo permite al sistema inmune responder y “defender” ante una enfermedad particular. Se han empleado bacterias, levaduras, y células animales como sistemas de expresión de vacunas recombinantes. Una de las aplicaciones más prometedoras de las plantas como biorreactores para producir vacunas es su potencial uso para la producción de antígenos en tejidos vegetales comestibles (vacunas comestibles). La producción de proteínas antigénicas en los tejidos vegetales permitiría protegerlas de la degradación en el tracto gastrointestinal⁶. Algunas vacunas expresadas en tabaco, arroz, maíz, soya, frijol, papa, tomate y banano han sido: Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.^{31,11,16,34} La subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB),^{18,7,32}. La subunidad B de la toxina de *Vibrio cholerae* (CTB)^{8,25,28}. La B-glicoproteína de citomegalovirus humano, el péptido D2 de *Staphylococcus*

aureus, la hemaglutinina, el epítipo de *Plasmodium falciparum* y la proteína G del virus de la rabia.^{35,5,3,14,36} Algunas vacunas con propósitos veterinarios también han sido expresadas en plantas, por ejemplo para la influenza aviar, la enfermedad de Newcastle y la hemaglutinina de la peste bovina expresada en maní.^{19,22,33}

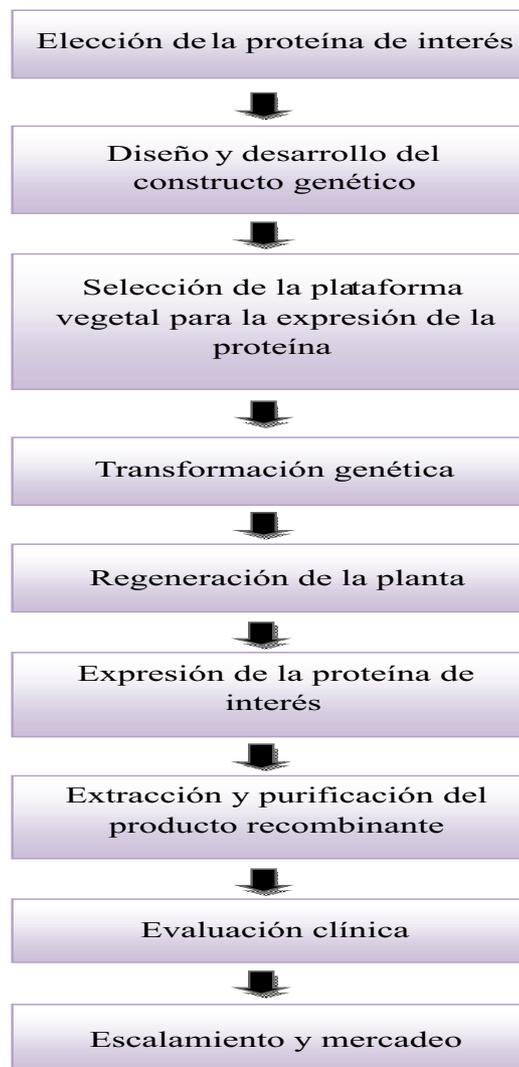


Figura 2. Esquema general para la producción de una proteína recombinante en plantas.

Tabla 1. Algunos productos recombinantes derivados de plantas actualmente en fase clínica, comercial o experimental^{29,17,27}.

Tabla 1. Algunos productos recombinantes derivados de plantas actualmente en fase clínica, comercial o experimental. ^{29, 17, 27.}

PLANTA	PRODUCTO RECOMBINANTE	COMPAÑÍA/ESTADO
Alazor	Insulina	SemBioSys Canadá
Alazor	Inmunosphere	SemBioSys Canadá
Alfalfa	Colágeno	Medicago Inc.
Arroz	Hirudina (Anticoagulante)	Applied Phytologies Inc.
Arroz	Lactoferrina	Ventria USA
Arroz	Lisozima Humana	Ventria USA
Arroz	Factor Intrínseco Humano HIF	Cobento Biotech AS- Dinamarca
Canola	Hirudina	SemBioSys Genetics Inc.
Cebada	DERMOkine e ISOkine (Factores de crecimiento)	ORF Genetics
Espinaca	Proteínas de fusión, epítopes de rabia	Thomas Jefferson University
Lechuga	Antígeno de superficie Hepatitis B (HBsAg)	Thomas Jefferson University
Maíz	Avidina (Proteína de la leche)	ProdiGene Inc.
Maíz	Hirudina (Anticoagulante)	EpicYTE Pharmaceutical Inc.
Maíz	Hirudina (Anticoagulante)	IPT, Monsanto
Maíz	Toxina Termo Lábil de <i>E. coli</i>	ProdiGene USA
Maíz	Proteína de la cápside del virus de la gastroenteritis (TEGV)	ProdiGene USA
Maíz	Lipasa Gástrica	Meristem Therapeutics France
Papa	Proteína de la cápside del virus de Norwalk	Arizona State University
Papa	Antígeno de superficie Hepatitis B (HBsAg)	Arizona State University
Papa	Antígeno de superficie Hepatitis B (HBsAg)	AltaGen Bioscience Inc.
Tabaco	Colágeno	Meristem Therapeutics
Tabaco	Colágeno	Crop Tech Corp
Tabaco	SEAP humana (Fosfatasa alcalina)	Large Scale Biology Corp.
Tabaco	Inmunoglobulina G1 (IgG1)	EpicYTE Pharmaceutical Inc.
Tabaco	Linfoma no Hodkings	Large Scale Biology USA
Tabaco	Antígeno Parvovirus felino	Large Scale Biology USA
Tabaco	Antígeno Papiloma Virus	Large Scale Biology USA
Tabaco	Proteína HN del virus de Newcastle	Dow Agro Sciences
Tabaco	Vacuna contra H5N1	Medicago USA
Tabaco	Anticuerpo contra caries (CaroRX)	Planet Biotechnology USA
Tabaco	Terapia contra cáncer (DoxoRx)	Planet Biotechnology USA
Tabaco	Resfriado (RhinoRx)	Planet Biotechnology USA
Tabaco	IgG (ICAM1)	Planet Biotechnology USA
Tabaco	Anticuerpos contra Hepatitis B	CIGB Cuba
Tabaco	Alfa-Galactosidasa	Planet Biotechnology USA
Tabaco - Células en	Proteínas HN del virus de Newcastle	Dow Agro Sciences

Anticuerpos recombinantes

Son complejos glicoprotéicos que reconocen y se unen específicamente a un antígeno. La individualidad y especificidad de unión permite que los anticuerpos puedan ser utilizados en un amplio rango de aplicaciones como diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades²³. Algunos anticuerpos recombinantes expresados en tabaco, arroz y arábidopsis son: IgG1 contra el antígeno carcinogénico, empleado en la terapia contra el cáncer de colon y seno; anticuerpo mAb-so57 empleado como tratamiento para el virus de la rabia; IgA/G-S1IgA/G contra antígenos de superficie de *Streptococcus*; Inmunoglobulina A, G, DigA y s1gA contra proteínas de la cápside viral del herpes virus simple, empleado como inmunoprotección contra herpes genitales; anticuerpo m-Ab contra CD30 humano, empleado en el tratamiento del linfoma de Hodgkin; anticuerpo MAK33IgG1 contra la creatinina quinasa humana MM empleado en enfermedades cardíacas, desórdenes mitocondriales, miopatías, miastenia y enfermedad de McArdle; fragmento Fab de MAK33 empleado en enfermedades neuronales, reumáticas y otras que alteran los niveles de creatinina quinasa sérica; 38C13scFv empleado en el tratamiento de linfoma de célula.²¹

Proteínas sanguíneas y otras proteínas y péptidos de uso clínico

Las proteínas sanguíneas son proteínas encontradas en el plasma sanguíneo con diversas funciones como: El transporte de diversas moléculas (lípidos, hormonas, vitaminas y minerales); otras proteínas son enzimas

que participan en el metabolismo de diversos compuestos celulares y otras se encargan del mantenimiento y regulación del sistema inmune. Las proteínas sanguíneas son ampliamente empleadas para diagnóstico de diversas enfermedades, por ejemplo, la albúmina, proteína sanguínea producida en el hígado, representa el 50% de las proteínas plasmáticas. Alteración en los niveles normales de albúmina puede ser asociada a enfermedad hepática, renal o sistémica.²⁰ Algunas proteínas séricas expresadas en plantas son: albúmina, aprotinina, encefalina, hemoglobina, antitripsina α 1. Otras proteínas con actividad enzimática expresadas en plantas son la proteasa C, glucocerebrosidasa, la lipasa gástrica canina, acetilcolinesterasa humana y la transglutaminasa humana. Algunas proteínas y péptidos de uso clínico expresados en plantas son el colágeno, huridin, endostatin y lactoferrín, el factor estimulante del macrófago, interferón α , interferón β , interferón γ , hormona de crecimiento humano, eritropoyetina, factor de crecimiento vascular endotelial e interleukina^{2,6,10,12} y factor de crecimiento de interleukina.²¹

Conclusión

El uso de plantas transgénicas es una herramienta ampliamente utilizada durante los últimos años con alto impacto en la salud humana debido a su gran potencial para ser empleada como una alternativa para incrementar la producción de vacunas, anticuerpos, proteínas y diversos compuestos de interés biofarmacéutico a gran escala. El desarrollo de nuevos promotores, desarrollo de nuevas herramientas

bioinformáticas, el mantenimiento de la estabilidad de la proteína recombinante, el incremento de la eficiencia de transformación y la optimización de los procesos de extracción son nuevos y atractivos focos de investigación. Sus resultados serán traducidos en incrementos de producción, simplificación de procesos y en facilidad para la expresión y producción de una gran diversidad de proteínas o moléculas recombinantes que podrán ser empleadas para inmunización, diagnóstico y/o tratamiento de múltiples enfermedades humanas. La expresión en tejidos de almacenamiento como semillas o tubérculos en los que las proteínas recombinantes pueden permanecer estables por largos periodos a temperatura ambiente, removerá la necesidad de establecer y mantener la cadena de frío para el mantenimiento de la actividad de la proteína. Esta una de las grandes limitaciones para la distribución de vacunas en muchas regiones del mundo. Además, la posibilidad de generar vacunas comestibles obviará el uso de agujas empleadas en tratamientos inmunoprotectores; la demanda para el acceso y uso se verán incrementadas significativamente.

Agradecimientos

A Martha Lucia Orozco, directora de Plant Transformation Center -PTRC- Universidad de California Riverside por su autorización para el uso de las fotos de las páginas 1 y 3. Plantas de tomate transgénicas creciendo *in vitro* en medio de selección (Kanamicina 100mg/L) y plantas transgénicas expresando el gen reportero GUS respectivamente.

Referencias

1. Alderborn A, Sundström J., Soeria-Atmadja D., Sandberg M., Andersson H.C. and Hammerling U. (2010). Genetically modified plants for non-food or non-feed purposes: Straightforward screening for their appearance in food and feed. *Food and Chemical Toxicology*; 48:453-464.
2. Barta A, Sommengruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM. (1986). The expression of a napoline synthase human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol*;6:347-57.
3. Beachy RN, Fitch JH and Hein MB. (1996). Use of plant viruses for delivery of vaccine epitopes. *Ann NY Acad Sci*; 792:43-49.
4. Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD. (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*;304:184-7.
5. Brennan FR, Bellaby T, Helliwell SM, Jones TD, Kamstrup S, Dalsgaard K, Flock JI and Hamilton WD. (1999). Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune responses in mice. *J Virol*;73:930-938.
6. Bravo AF, Wirth S, Segretin ME y Morgenfeld M. (2005). Las plantas como fábricas de proteínas terapéuticas. INGEBI-UBA-CONICET. Pp 40-43.

7. Chikwamba R, McMurray J, Shou H, Frame B, Pegg SE, Scott P, et al. (2002). Expression of a synthetic *E. coli* heat-labile enterotoxin B sub-unit (LT-B) in maize. *Mol Breed*;10:253–65.
8. Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO. (2001). Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol*;311:1001–9.
9. De Muynck B, Navarre C, Nizet Y, Stadlmann J, Boutry M. (2009). Different subcellular localization and glycosylation for a functional antibody expressed in *Nicotiana tabacum* plants and suspension cells. *Transgenic Res*;18:467–82.
10. Goodner B, Hinkle G, Gattung S, Miller N, Blanchard M, Qurollo B, Goldman BS, Cao Y, Askenazi M, Halling H et al. (2001). Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2323–2328
11. He Z, Jiang XL, Qi Y, Di QL. (2008). Assessment of the utility of the tomato fruit-specific E8 promoter for driving vaccine antigen expression. *Genetica*;133:207–14.
12. Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*; 342:76–8.
13. Hood EE, Witcher DR, Maddock S, Meyer T, Baszczyński C, Bailey M, et al. (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extractio and purification. *Mol Breed*;3:291–306.
14. Huang Z, Dry I, Webster D, Strugnell R and Wesselingh S. (2001). Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*; 19: 2163–2171.
15. Kapila J, De Rycke R, van Montagu M, Angenon G. (1997). An agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122:101–8.
16. Kumar GBS, Ganapathi TR, Revathi CJ, Srinivas L, Bapat VA. (2005). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta*;222:484–93.
17. Lau OS, Sun SSM. (2009). Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnol Adv.* 27:1015–22.
18. Lauterslager TGM, Florack DEA, Van der Wal TJ, Molthoff JW, Langeveld JP, Bosch D, et al. (2001). Oral immunization of naïve and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. *Vaccine.* 19:2749–55.
19. Lentz EM, Segretin ME, Morgenfeld MM, Wirth SA, Santos MJD, Mozgovoij MV, et al. (2010). High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants. *Planta.* 231:387–95.
20. Levit G, Rodríguez SM. (2008). Uso de la albúmina en la práctica clínica.

- Publicaciones originales. Universidad del Rosario. Santa Fe. Republica Argentina. Pp 1-2.
21. Liénard D, Sourrouille C, Gomord V, Faye L. (2007). Pharming and transgenic plants. *Biotechnol. Ann Rev* 2007;13:115–47.
 22. Ling H-Y, Pelosi A, Walmsley AM. (2010). Current status of plant-made vaccines for veterinary purposes. *Expert Rev Vaccin*;9:971–82.
 23. Ma JK, Drake PM, Christou P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet*; 4:794–805.
 24. McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, Koprowski H and Michaels FH. (1995). Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology (NY)*. 13:1484–1487.
 25. Mishra S, Yadav DK, Tuli R. (2006). Ubiquitin fusion enhances cholera toxin B subunit expression in transgenic plants and the plant-expressed protein binds GM1 receptors more efficiently. *J Biotechnol*; 127:95-108.
 26. Molina M. I. (2008). Vacunas transgénicas. <http://www.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/TrabajosSelecc/IsabelMolina.pdf>
 27. Naqvi S, Ramessar K, Farré G, Sabalza M, Miralpeix B, Twyman R, Capell T, Zhu Ch., Christou P. (2011). High-value products from transgenic maize. *Biotechnology Advances* 29:40-53.
 28. Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, et al. (2007). Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain and needle-free vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA*;104:10986–91.
 29. Obembe O., Popoola J., Leelavathi S., and Reddy S.. (2010) Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*. 29:2. 210-222.
 30. Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, Bock R. (2009). Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J*;57: 436–45.
 31. Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS. (2000). Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol*;18:1167–71.
 32. Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Alpuche-Solís ÁG, Martínez-González L, Korban SS. (2010). Expression of an immunogenic F1-V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague. *Planta*, doi:10.1007/s00425-010-1176-z.
 33. Satyavathi VV, Prasad V, Khandelwal A, Shaila MS, Sita GL. (2003). Expression of hemagglutinin protein of rinderpest virus in transgenic

- pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.)].
Millsp. 34. *Plant Cell Rep*;21:651–8.
34. Sojikul P, Buehner N, Mason HS. (2003). A plant signal peptide hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *Proc. Natl Acad Sci USA*;100:2209–14.
35. Tackaberry ES, Dudani AK, Prior F, Tocchi M, Sardana R, Altosaar I and Ganz PR. (1999). Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine*;17:3020–3029.
36. Turpen T, Reinl S, Charoenvit Y, Hoffman S, Fallarme V and Grill L. (1995). Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Biotechnology (NY)*;13.
37. Twyman R.M., Christou Paul, and Stoger Eva. Genetic Transformation of Plants and Their Cells (2002). Molecular Biotechnology Unit, John Innes Centre, Norwich, United Kingdom.