



EVOLUCIÓ I APLICACIONS DE L'ENGINYERIA GENÈTICA A LES PLANTES CULTIVADES, HISTÒRIA DE LA VACUNACIÓ

· 19 de juny del 2023 a les 8 del vespre
· Sala d'actes del Centre Cultural La Llacuna, Andorra la Vella



Teresa Capell i Capell

Doctora en farmàcia, catedràtica, Grup de Biotecnologia Vegetal Aplicada,
Universitat de Lleida-Agrotecnio

▲ CURRÍCULUM

Nascuda a Torregrossa, és llicenciada (1990) i doctora (1994, Fisiologia Vegetal) en Farmàcia per la Universitat de Barcelona. L'any 1995 va anar a fer recerca postdoctoral al John Innes Centre a Norwich al Regne Unit amb una beca INIA. En aquest Centre es va convertir en cap d'equip i va enregistrar les seves 2 primeres patents.

- 1995-1998, Becària post-doctoral al Departament de Genètica Aplicada i Unitat de Biotecnologia Molecular, John Innes Centre, Norwich, UK
- 1998-2001, Cap de grup, Unitat de Biotecnologia Molecular, John Innes Centre, UK
- 2002-2004, Cap de grup, Departament de Genètica de Cultius i Biotecnologia, Fraunhofer, IME, Germany
- 2004-2009, Cap de grup, Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, ETSEA-UdL, Lleida
- 2009-2011, Professora agregada, UdL
- 2011- actualitat, Catedràtica contractada, UdL

Va iniciar el seu camí a la Universitat de Lleida (UdL), concretament a l'Escola d'Agrònoms de Lleida l'any 2004 com a investigadora Ramon y Cajal provinent de l'Institut Fraunhofer de Biologia Molecular i Ecologia Aplicada (Alemanya).

Des del 2011, és Catedràtica de la UdL, on imparteix docència en programes de Màster i de grau de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària. És membre del grup de recerca Unitat de Biotecnologia i Bioeconomia Agrària i les seves línies d'investigació estan directament relacionades amb l'enginyeria genètica de plantes per a la producció de molècules d'ús farmacèutic i per a la seva millora nutricional i ha coordinat el Grup de Recerca Consolidat en Biotecnologia Vegetal Aplicada.

Fruit de la seva tasca investigadora, ha publicat 150 treballs en l'àmbit de la biotecnologia vegetal, 28 capítols de llibre, 18 articles de divulgació i ha presentat, 137 comunicacions orals i 151 en forma de pòsters a congressos. Cal remarcar que ha contribuït en 4 patents.

La Dra. Capell ha supervisat i dirigit 27 treballs entre treball de Màster i Tesis doctorals. És editora associada de la revista Transgenic Research i avaluadora d'agències de finançament nacionals i internacionals. També

cal destacar que ha estat membre electe del Claustre de la UdL, Membre de la Comissió Docent i de la Comissió d'Investigació del Departament i Membre de la Comissió de Bioseguretat de la UdL. L'any 2016 va ingressar com a Acadèmica Corresponent a la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya (RAFC) i tres anys més tard, també com a Acadèmica Corresponent a l'Acadèmia de Ciències Veterinàries de Catalunya (ACVC). L'11 de gener del 2023 va passar a ser membre numerari de la RAFC. L'any 2011 va rebre el I Premi lleidatans de la Jove Cambra Internacional de Lleida. L'any 2012 el VLI Premio de Libro Agrario (Fira Agrària de Sant Miquel). L'any 2019 va rebre el Premi Mensa al Coneixement. L'any 2020 va rebre la distinció de Gran persona de Lleida pels Armats de Lleida i aquell mateix any, li fou atorgada la Creu de Sant Jordi.

Introducció

El 1983 es va publicar l'assoliment de la primera planta de tabac transgènica tolerant a un agent selectiu, el cloramfenicol (Herrera-Estrella *et al.*, 1983). En aquell moment només el tabac responia positivament a la transformació genètica. La fulla de tabac trossegada i cultivada en medi sòlid era un bon teixit diana per ser infectat per *Agrobacterium*, que li transferia els seus gens. Però calia que, paral·lelament, les cèl·lules de les fulles transformades regeneressin un altre cop la planta de tabac sencera i fèrtil. Les tècniques de cultiu *in vitro* de teixits vegetals van ser essencials en l'avanç de la tecnologia de l'ADN recombinat. Ara, quaranta anys després s'ha assolit la transformació de la majoria d'espècies de plantes cultivades, amb una col·lecció de gens que els donen avantatges en el cultiu (millora agronòmica), característiques noves (millora nutricional) o les converteixen en productores de molècules d'ús farmacèutic (fàbriques de molècules). En aquesta presentació els explicaré com es fan aquestes plantes i els posaré exemples del seu ús en projectes de recerca i com a productes comercials.

L'evolució de la biotecnologia

La *biotecnologia* o *tecnologia viva* es defineix com l'art d'utilitzar els organismes vius i allò que produeixen per al benefici dels humans i animals. De fet, els orígens de la biotecnologia es remunten als pagesos del neolític. D'aleshores ençà, l'home ha utilitzat la millora genètica selectiva (més o menys empírica) per tal d'assolir una major diversitat animal i vegetal; gràcies a això ha estat possible la domesticació de les plantes i dels animals. Però si volem filar més prim i trobar quina va ser la primera aplicació biotecnològica, ens hem de fixar un altre cop en els pagesos del neolític i veure que feien ús dels bous i els ases per llaurar: aplicaven una tècnica viva que els facilitava remoure la terra. Aquestes civilitzacions antigues (sumeris, egipcis...) van contribuir al progrés de la biotecnologia a nivells insospitats. L'ús de microorganismes per a l'obtenció de productes o per a la millora de processos era un fet estès, tot i que es desconegué la presència d'organismes vius. El vi, el pa i la cervesa eren i són aliments derivats de l'aplicació biotecnològica. Els grecs afegien bacteris a la llet per elaborar els iogurts, i encara ho fan! També se n'agreguen a la llet per a la producció del formatge; però ara, enlloc de tots els bacteris extrets de l'estómac de remugadors joves, només se n'afegeix la proteïna necessària per al quall; aquesta proteïna (quimosina) prové de bacteris transgènics o recombinats. Aquest nou procés de producció de formatge permet que pugui ser consumit pels vegetarians.

El panís dels nostres camps no és el que es trobava originàriament 9.000 anys enrere a Mèxic. Al seu moment ja va patir millores genètiques que han donat pas a un panís millorat artificialment arran d'un procés de domesticació. La decisió d'un pagès de plantar la llavor més gran o la d'un altre de seleccionar la planta que tenia una mutació per reduir-la fins a l'aparició d'una sola tija, va possibilitar que aquell ancestre silvestre, el *teosinte* (en l'actualitat, considerat una mala herba que requereix d'herbicides per eliminar-la dels camps de cultiu), es convertís en el panís que en Cristòfol Colom va introduir a Europa després de la descoberta del continent americà. El panís presenta una gran variabilitat genètica, tal com queda palès amb l'existència de moltes races i varietats. Aquestes últimes van acompanyades d'una àmplia gamma de colors del pericarpi, però curiosament totes tenen l'endosperma blanc, per la qual cosa la farina que se n'obté sempre és d'un blanc grogós. Així mateix, durant el procés de domesticació, les plantes van experimentar

canvis en la grandària del fruit i de les fulles, en el sabor, en el color, en el nombre de llavors (que, en alguns casos, va augmentar-ne i en altres va disminuir-ne). Ara bé, el que està clar és que de les varietats autòctones i primigènies, van sortir-ne les cultivades a Europa. Tanmateix, la introducció de programes de millora ha produït els parentals dels híbrids que s'utilitzen actualment. Un híbrid és el resultat del creuament de dues línies pures. El vigor híbrid ha resultat clau en el substancial increment de les produccions de panís. L'inconvenient que té és que el pagès no pot guardar la llavor per plantar-la l'any següent. En cas de fer-ho, les llavors germinarien i donarien lloc a plantes molt desiguals, és a dir, tots els parentals emprats al llarg de diverses generacions per assolir l'híbrid final creixerien al camp. La conseqüència d'això serien unes plantes molt altes i febles o baixes i robustes, amb pinyes grosses o sense, que impediria la feina de la recol·lectora de cereals a l'hora de fer la collita. Per aquest motiu, els pagesos que planten híbrids han de comprar les llavors cada any. Succeeix igual amb les hortalisses i altres cultius; si la llavor és híbrida, es fa necessari adquirir-la anualment a l'empresa que ha fet l'híbrid.

Els científics del segle passat que realitzaven programes de millora de plantes es basaven en els principis genètics de les lleis de Mendel per realitzar els seus experiments. A mitjan segle xx es comencen a aplicar criteris científics i tecnològics en la producció agrícola. S'incrementa la superfície cultivada i els cultius de regadiu, i s'apliquen fertilitzants químics que substitueixen parcialment els adobs orgànics. A més, amb l'agricultura intensiva apareixen les plagues i l'ús de plaguicides. Tot plegat té un impacte social, econòmic i ambiental molt gran.

Però, de fet, l'enginyeria genètica moderna es va iniciar a la segona meitat del segle xx (anys setanta), amb el descobriment de les endonucleases (proteïnes que poden tallar l'ADN en un lloc molt específic). Aquestes van proporcionar als científics una eina capaç de seccionar i modificar qualsevol tipus d'ADN. D'aquesta manera va aparèixer la tecnologia de l'ADN recombinant que permet tallar i enganxar trossos d'ADN mitjançant noves combinacions, provinents del mateix organisme o d'organismes diferents. L'enginyeria genètica és una tècnica de la biotecnologia que s'utilitza per modificar, eliminar o introduir gens en el genoma d'un organisme, i la seva finalitat es troba en l'obtenció de productes beneficiosos per als éssers vius. L'enginyeria genètica té aplicacions a la ramaderia, l'agricultura, la indústria química i la medicina. Una d'aquestes no és cap altra que la de produir plantes transgèniques per a l'agricultura, amb la introducció d'un o de diversos gens, o amb la modificació de la tasca d'un gen propi. Es persegueixen diversos objectius, com la consecució de plantes amb llurs qualitats nutricionals millorades, protegides dels insectes que les ataquen, o per tal de convertir-les en productores de proteïnes i molècules d'ús farmacèutic (*Molecular pharming*).

S'ha de dir que actualment, malgrat el que es creu en general, no hi ha aliments transgènics com a tals als prestatges dels supermercats europeus. El que hi ha, en canvi, són llurs subproductes (el midó del blat de moro o la lecitina de la soja) barrejats amb altres coses, com la Coca-Cola, els Kit Kat o la sopa de lluna de la marca Campbell. Als Estats Units sí que hi ha dues fruites que es consumeixen: la papaia i la poma transgènica, a més d'una hortalissa, la patata. Al Brasil consumeixen la mongeta, que expressa un gen Bt, però a Europa no es troba cap d'aquests productes. L'única planta transgènica que es cultiva a Europa és el panís Bt per a la producció de pinso, acceptada també per al consum humà. L'explicació que és el panís Bt es troba en un apartat posterior.

La millora genètica aplicant la tecnologia de l'ADN recombinant

La millora genètica tradicional té una limitació: no pot anar més enllà del creuament entre organismes de la mateixa espècie, sexualment compatibles. En alguns casos s'ha aconseguit el creuament d'organismes de dues espècies diferents i el resultat d'aquest procés ha estat un híbrid. Un exemple molt clar n'és la mula (creuament d'euga i ruc). Però, com podem introduir una característica nova en un organisme que no tingui cap parent pròxim, compatible sexualment, que la contingui? La tecnologia de l'ADN recombinant hi va donar la resposta: és possible identificar el gen, copiar-lo i introduir-lo, mitjançant tècniques d'enginyeria genètica, a un altre organisme que podia ser de la mateixa espècie o d'una espècie totalment diferent. D'aquesta forma es trencava la limitació de la transferència de gens només entre espècies sexualment compatibles. Així mateix, existeixen diverses denominacions segons com s'integri en l'organisme el gen forà després del procés de transformació d'un animal, d'una planta o d'un bacteri. L'organisme es denomina transgènic quan el gen forà que s'introdueix queda integrat de forma permanent al seu genoma (animal o planta), i l'organisme es denomina recombinant quan el gen forà roman a l'organisme sense enganxar-se al seu genoma. És el cas dels bacteris i dels llevats.

La introducció natural de gens (biològica)

Tots hem vist en ocasions els nusos que es formen en arbres i plantes i l'aspecte tan característic que els donen. Es denominen *crown gall* o, si ho traduïm al català, *agalla de la tija* o *de la corona*. Es poden veure en oliveres, vinyes, pomeres, rosers, dàlies, begònies, etc. Aquests bonys són causats per la infecció del bacteri *Agrobacterium tumefaciens*, que viu habitualment en el sòl. Com a conseqüència d'una ferida al tronc (per exemple, en rosegar-lo un conill), l'escorça de l'arbre es pot trencar: és el moment i el lloc en què el bacteri aprofitarà per iniciar la seva infecció, que posteriorment provocarà la formació de tumors. El bacteri utilitza el metabolisme de les cèl·lules de l'arbre per a la producció d'unes molècules, les opines, que són el seu aliment. Ara bé, cal que el bacteri doni instruccions precises a la cèl·lula hoste de com ho ha de fer. La informació es troba en alguns dels gens del bacteri, que aquest transfereix i que queden integrats permanentment al genoma de la planta. A partir d'aquell moment, la planta resta transformada de forma natural i es converteix en una fàbrica de producció de molècules per a l'alimentació del bacteri.

L'any 1978 el grup del Dr. Mark Van Montagu, de Bèlgica, va descobrir com el bacteri *Agrobacterium tumefaciens* transformava de forma natural les plantes que infectava. Va identificar els gens específics del bacteri que eren transferits a la planta i els va modificar de tal manera que quan els bacteris torressin a infectar una planta li conferissin una característica nova. Els investigadors han aprofitat aquesta capacitat de transferir gens manipulant la peça d'ADN que s'incorpora a la planta per incloure-hi els gens que es volen transferir. El 1983 es va publicar l'assoliment de la primera planta de tabac transgènica tolerant a un agent selectiu, el cloramfenicol (Herrera-Estella *et al.*, 1983). En aquell moment només el tabac responia positivament a la transformació genètica. Podem veure, doncs, que estem davant d'una tecnologia relativament recent si ho comparem amb l'enginyeria genètica aplicada als microorganismes, ja que l'any 1982 ja va iniciar-se la dispensació a l'usuari de l'humulina. Es

denomina *humulina* la insulina recombinant que va ser produïda per l'empresa Genentech l'any 1978 en el bacteri *Escherichia coli* i se n'inicia la seva comercialització l'any 1982. Avui dia tota la insulina dispensada prové d'organismes recombinants.

La introducció de gens per mètodes físics (balística)

La possibilitat d'introduir característiques noves a les plantes i la importància econòmica que tenen els cereals va comportar que canviés el concepte que teníem sobre l'agricultura. L'*Agrobacterium* té un nombre limitat d'hostes als quals pot infectar, cosa per la qual l'avançament de la millora genètica mitjançant l'enginyeria dels genomes tenia una limitació. Com es podrien introduir gens que milloressin les característiques dels cereals o de les plantes que no fossin susceptibles de ser infectats pel bacteri?

Llavors van dirigir la mirada cap a la transferència directa de gens ja realitzada per John C. Sanford l'any 1983. Van apostar per la transformació mitjançant balística en el teixit animal, i J. Williams (1991) va introduir gens forans en teixits d'un ratolí viu mitjançant microprojectils recoberts d'ADN, dins de la recerca en altres àmbits. Es va intentar aplicar la mateixa tècnica directament sobre grans de pol·len, però es va comprovar que no era efectiva. Calia trobar teixits diana que poguessin ser receptors del gen als nuclis de les seves cèl·lules i que, paral·lelament, les transformades tinguessin la capacitat de regenerar un altre cop una planta sencera i fèrtil. Les tècniques de cultiu *in vitro* van agafar en aquest moment el protagonisme. Quins eren els teixits regenerables de l'arròs, el blat, el panís i la civada? Es va arribar a la conclusió que els embrions immadurs o madurs dels cereals eren un bon teixit. Els embrions es podien *desdiferenciar* a calls (un teixit blanquinós), ser bombardejats i, mitjançant l'optimització dels mitjans de cultiu i de les combinacions d'hormones, induir un altre cop l'aparició de teixit verd organitzat, fulles i arrels.

Adaptant el sistema de la pistola de gens es va veure que es podien disparar partícules microscòpiques d'or embolcallades amb els gens d'interès, que travessaven la paret cel·lular i arribaven fins al nucli. Un cop allí, els petits trencaments ocasionats pels perdigons d'or al genoma de la planta eren reparats ràpidament pels enzims nuclears, de forma que en refer el forat ocasionat, hi introduïen l'ADN nou que hi havia estat encastat. Aleshores aquest quedava integrat en el genoma de la planta i n'esdevenia una característica permanent (el gen forà s'enganxa a l'ADN de la planta i en passa a formar part, de manera que es transmet a les properes generacions). Aquesta circumstància permetrà introduir-hi determinades característiques de millora. Aquest és el sistema que s'utilitza actualment, encara que s'ha de buscar sempre el teixit diana adequat.

Aplicació de les eines biotecnològiques a la millora de les característiques agronòmiques de les plantes: el blat de moro Bt

La millora genètica a les plantes no es fa perquè sí. El cuc barrinador és la plaga més important que ataca el panís. Aquesta plaga la produeixen principalment les erugues de dues papallones: *Ostrinia nubilalis* i *Sesamia monagroides*. Pocs dies després d'haver dipositat els ous les papallones, emergeixen les erugues que s'alimenten de les tiges de les plantes, i hi fan forat i n'arriben a destruir la medul·la de la canya. En condicions favorables, es poden arribar a produir

fins a tres generacions d'erugues per any. Això suposa unes pèrdues grans de rendiment a les quals cal sumar els atacs directes sobre la panotxa. Les pèrdues en producció poden arribar al 30% de la collita. El control de la plaga del cuc barrinador s'ha intentat per diversos mètodes: control químic, utilitzant insecticides; control agronòmic, canviant els tipus de cultius; control biològic, fent ús de paràsits de les larves o dels ous; actualment, el control genètic, desenvolupant, mitjançant millora genètica clàssica, varietats noves resistents a l'atac de la plaga, o bé mitjançant la introducció d'un gen que protegeixi la planta -en aquest cas, seria transgènica-. L'aplicació d'insecticides és ineficaç, ja que les larves es troben normalment amagades dins de les canyes. El control agronòmic és bo si es combina amb altres mètodes. La lluita biològica en què s'utilitzen paràsits i depredadors pot tenir èxit, però també cal combinar-la amb algun altre mètode. Per aquesta raó, l'ús de varietats resistents a l'atac del cuc barrinador sembla la millor manera de controlar la plaga.

El bacteri Gram positiu *Bacillus thuringiensis* (Bt) que habita al sòl i que s'utilitza normalment com una alternativa biològica a l'ús de plaguicides, és la font de producció de la toxina Cry que se li extreu per a utilitzar-la com a plaguicida. Durant l'esperulació, moltes soques de Bt produeixen cristalls proteics, coneguts com a δ -endotoxines, que posseeixen propietats insecticides. Per aquesta raó s'ha utilitzat Bt, en forma de pols soluble, com a insecticida i, més recentment, per produir organismes genèticament modificats (OGM). El gen que codifica per aquesta proteïna ha estat clonat pels investigadors i introduït en plantes d'interès comercial, com el panís i el cotó, per tal de fer-les resistents a l'atac del cuc barrinador. És el que denominem habitualment panís Bt (imatge 1) i cotó Bt.



Imatge 1. Imatge de plantes de panís Bt al desembre després d'una nevada. Atès que el cuc barrinador no ha perforat la tija, les plantes no s'han trencat, cosa que millora l'eficiència de la màquina recol·lectora

Aplicació de les eines biotecnològiques per a la millora nutricional de les plantes cultivades: blat de moro que produeix carotenoides

Les hortalisses i les fruites proporcionen gairebé totes les vitamines i els aminoàcids essencials necessaris per mantenir la salut i el benestar en els éssers humans; ara bé, els cereals majoritaris, com el panís i l'arròs, són deficients en les vitamines i aminoàcids claus. Fins a un cinquanta per cent de la població mundial, principalment la gent pobre dels països en vies de desenvolupament, es veu afectada per aquestes deficiències a causa de la impossibilitat d'accedir a una dieta variada. Actualment, som més conscients de la importància de dur una dieta saludable i variada per evitar certs tipus de càncers, malalties cardiovasculars, etc. Davant de la distribució agrícola al món i de la dificultat de canviar de cultius a causa principalment de la manca d'aigua, la producció de plantes transgèniques amb un contingut elevat de vitamines

i d'aminoàcids podria contribuir a alleugerir aquestes deficiències. A més a més, ens trobem amb un problema molt gran d'immigració. Poblacions senceres abandonen les seves àrees. La inestabilitat política n'és una raó, però sempre va acompanyada de la fam. La gent deixa casa seva per cercar menjar. Un clar exemple són les migracions de l'Àfrica subsahariana, i Europa n'és majoritàriament el continent recipient. Pot ser que fins i tot hi hagi terra per cultivar, però la inestabilitat política no ho permet.

Els carotenoides són pigments grocs (donen el color al panís groc), taronges (per exemple, la provitamina A dona el color a la pastanaga) i vermells (per exemple, el licopè, que dona el color a la tomata) que es troben en moltes fruites i verdures. En molts països subdesenvolupats es fa servir panís totalment blanc per a ús humà. La farina que se'n obté no té gaire valor nutricional. Mentre que el panís que té color groc, del qual també s'obté una farina blanca, constitueix el menjar dels animals. És un fet cultural. No resultaria difícil fer un panís amb un valor nutricional afegit, per exemple vitamines o micronutrients, que, en ser consumit, pal·liés alguna de les carències inherents. La nostra idea va ser regenerar un panís que contingué provitamina A, vitamina C i àcid fòlic. Per a la producció de provitamina A són necessaris tres gens de la ruta dels carotenoides; per a la producció de la vitamina C, en cal un altre, i per a la producció d'àcid fòlic, un altre més. L'estratègia consisteix a copiar cinc gens d'organismes que els tinguin funcionant i introduir-los en la planta per reconstruir la ruta metabòlica que ens porti a la producció de provitamina A, vitamina C i àcid fòlic.

Un cop identificades les seqüències dels gens que ens fan falta a les bases de dades, com NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), empreses especialitzades en aquest tipus de serveis les sintetitzen i ja podem preparar el còctel que contindrà tots els gens. Aquests són introduïts mitjançant la pistola de gens al nostre teixit diana, i mitjançant l'aplicació de tècniques de cultiu *in vitro*, regenerarem plantes que tindran les pinyes de diferents colors, segons la dotació genètica que hagin integrat. D'aquesta manera, hem assolit uns nivells elevats de provitamina A que donen una coloració ataronjada característica de la provitamina A, o vermella que prové de l'acumulació del licopè com la tomata (imatge 2; Naqvi et al., 2009).



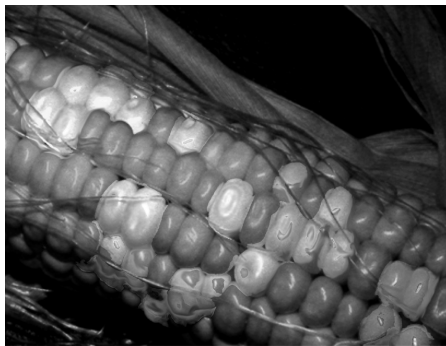
Imatge 2. Imatge de panotxes de panís de colors diferents segons la dotació de gens de la ruta dels carotenoides que expressin (Naqvi et al., 2009)

Aplicació de les eines biotecnològiques per a la producció de medicaments: fàbriques moleculars (traducció de l'anglès Molecular Pharming)

Una de les aplicacions de la biotecnologia són les fàbriques de molècules (agricultura molecular), que es basa en la producció de proteïnes per ser utilitzades com a medicaments –per exemple,

anticossos contra la sida— en plantes cultivables. Fins ara, les proteïnes d'ús farmacèutic —com els anticossos o els enzims— es produïen en cultius transgènics de cèl·lules d'ovari d'hàms xinès (CHO), però el cost econòmic d'aquest sistema és molt elevat. Les plantes permeten produir aquestes proteïnes de forma més barata i segura, a més d'oferir molts més avantatges respecte als sistemes de producció basats en cèl·lules de mamífers. Les plantes són més segures perquè, a diferència dels cultius de les cèl·lules CHO, és impossible que es contaminin amb patògens humans o animals; a més, tenen la capacitat de produir proteïnes complexes i funcionals per als humans; i el més important, no són cares de cultivar ni de mantenir —perquè creixi una planta només es necessita terra, aigua, fertilitzants barats i llum solar (res a veure amb els sistemes cars i complexos de fermentadors on són cultivades les cèl·lules dels mamífers). Les proteïnes es poden extreure i purificar fàcilment dels teixits vegetals seguint procediments estàndards. Així mateix, després d'analitzar un gran nombre de plantes diferents, s'ha arribat a la conclusió que les que millor responen en el camp de l'agricultura molecular són els cereals, especialment les seves llavors. Aquestes són un òrgan d'emmagatzematge de proteïnes i, conseqüentment, poden aplegar-ne grans quantitats a temperatura ambient. Fins i tot del reticle endoplasmàtic se'n deriven uns compartiments induïts per les proteïnes recombinants que s'hi acumulen, es denominen cossos Stöger. Aquest tipus de producció i emmagatzematge del medicament comportaria un gran alleujament en els països pobres africans que no disposen de neveres per conservar-los, però la normativa europea en el cultiu de plantes transgèniques adoptada per molts d'aquest països en frena el seu desenvolupament.

Al Grup de Biotecnologia Vegetal Aplicada de la Universitat de Lleida treballem en la utilització dels cereals com a plataforma de producció de molècules pel seu ús en la vacunació. Hem utilitzat l'arròs des del 2005 (Nicholson *et al.*, 2005) com a plataforma de producció d'anticossos i lectines antivirals. En experiments posteriors hem regenerat plantes de panís (imatge 3; Ramessar *et al.*, 2008) i d'arròs transgèniques en les quals les llavors expressaven l'anticòs 2G12 (Vamvaka *et al.*, 2016a), d'arròs amb la lectina antiviral grifitsina (Vamvaka *et al.*, 2016b) i la lectina antiviral cianovirina-N (Vamvaka *et al.*, 2016c), molècules, totes tres, capaces de neutralitzar el VIH. Més tard ens vam atrevir a expressar simultàniament totes tres molècules per demostrar una sinergia positiva en la neutralització del virus causant de la sida (Vamvaka *et al.*, 2018). Amb aquests experiments vam demostrar que el panís com l'arròs transgènic podrien ajudar a satisfer la demanda massiva d'un tipus de compostos per a vacunes i obríem les portes a la producció de molècules per a combatre altres malalties infeccioses com la covid-19.



Imatge 3. Imatge de panotxa de panís que acumula l'anticòs 2G12 que neutralitza el virus de la sida. Els grans fluorescents vermells acumulen l'anticòs i també expressen el gen del corall vermell DS red per tal de ser fluorescents i indicar que han estat modificades (Ramessar *et al.*, 2008)

Recerca sobre vacunes contra la covid-19 a la Universitat de Lleida

La intensa demanda de vacunes i reactius per combatre la covid-19 ha donat lloc a la recerca d'estratègies més competitives per produir a gran escala les molècules que s'han utilitzat més, la proteïna S i el seu fragment RBD (Capell *et al.*, 2020). Les plantes ofereixen una plataforma de producció econòmica per a l'obtenció de proteïnes recombinants d'ús farmacèutic, vacunes i reactius de diagnòstic. Durant la pandèmia s'ha avaluat el seu ús per a la producció de subunitats recombinants en vacunes i en equips de detecció per a la covid-19. Ja se'n tenien coneixements previs, perquè s'havien completat els assaigs clínics per a diversos candidats a vacuna contra la grip produïts per expressió transitòria en plantes de *Nicotiana benthamiana* (Ward *et al.*, 2020). L'ús de plantes com a sistema d'expressió transitòria per a la producció de molècules d'ús farmacèutic o subunitats d'ús en vacunes i equips de detecció, té l'avantatge de la rapidesa i la facilitat amb què es pot incrementar la producció i, per tant, es pot utilitzar per a produir nous components de vacunes que poden ser candidates a proves clíniques en qüestió de setmanes o mesos. El mateix sistema d'expressió s'ha utilitzat per a desenvolupar vacunes contra la covid-19 i s'han completat proves clíniques gràcies a les facilitats donades per l'FDA i l'EMA, que han resultat en la primera vacuna produïda en plantes que ja he mencionat de Medicago, Canadà. La mateixa plataforma s'ha utilitzat per a proporcionar reactius per als equips de diagnòstic de la covid-19. De forma semblant, la transformació estable amb l'obtenció de plantes transgèniques proporciona un recurs a més llarg termini per a la producció de molècules amb un cost més competitiu i sostenible. Aquesta forma de producció pot ser ideal per obtenir reactius i vacunes per a campanyes globals de reforç de la vacunació. L'avantatge que ens proporcionen els cultius transgènics és que es poden conrear a tot el món i poden proporcionar fonts locals de vacunes i reactius. La producció d'antígens en cereals permet l'ús de les infraestructures locals per a la producció, emmagatzematge i distribució (Ma *et al.*, 2003; Ramessar *et al.*, 2008a, 2008b). Els cereals són especialment adequats per a la producció a gran escala als països en desenvolupament perquè les llavors que contenen les proteïnes recombinants es poden emmagatzemar i transportar sense utilitzar la cadena de fred (Mir *et al.*, 2019).

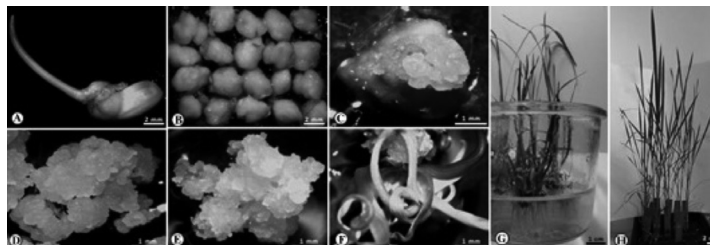
Inici de la recerca per a la producció d'una vacuna contra la covid-19 a la Universitat de Lleida

La necessitat d'aportar solucions per tal de reduir el nombre d'infeccions i l'experiència acumulada durant els anys en la producció de components de vacunes per al VIH van fer que el consorci europeu Pharmafactory (<https://pharmafactory.org/>) prengués la decisió d'ampliar els seus objectius i intentar produir components per a una vacuna contra la covid-19 en tots els sistemes experimentals inclosos en el projecte. La nostra part d'aquesta recerca estava basada en la transformació d'arròs utilitzant els genotips asiàtics de molt bona transformació EY1105 i Nipponbare, de què disposàvem al laboratori i que ens eren subministrats per diferents centres productors d'arreu del món, com l'IRRI de les Filipines i la Rice Research Station de Louisiana, als Estats Units. Normalment, una vegada a l'any rebíem les llavors per a la transformació. Les mesures extremes que es van haver d'aplicar per a la contenció de l'expansió de la pandèmia, com els períodes de confinament, van tenir un impacte tant global com local. A nosaltres

ens va afectar la recerca en no poder rebre les llavors d'arròs per als nous experiments de transformació. Per a aquest experiment, ens calia arròs que tingués l'embrió; el que trobem a les botigues no en té. Va ser la generositat d'un pagès del delta de l'Ebre, el productor Illa de Riu (<https://www.illaderiu.com/en/home-3/>), la que ens va solucionar el problema. Ens va fer arribar, no sense dificultats, dos quilos de la llavor de sembra que li havia quedat de l'any anterior. El desafiament que se'ns presentava era doble: aconseguir posar a punt el sistema de transformació d'un genotip local, concretament l'arròs bomba tan popular per a cuinar la nostra paella, i produir en l'arròs el component RBD per a la vacuna contra la covid-19, tan necessari per a frenar la pandèmia.

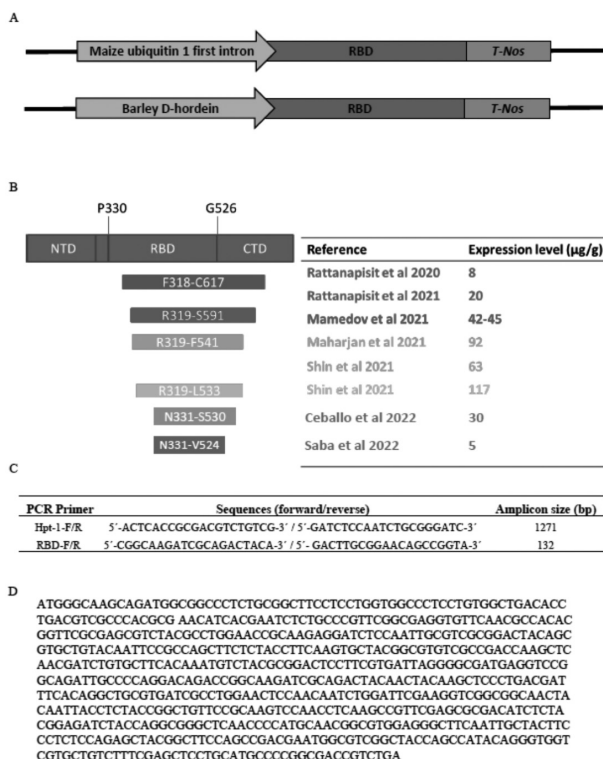
Producció de la subunitat RBD de la covid-19 en l'arròs bomba

Un cop vam rebre les llavors, vam iniciar el procés de posar a punt el sistema de transformació de l'arròs bomba. Vam determinar la millor mida dels embrions per ser aïllats; eren sis i set dies després de la inducció del creixement (imatge 4A), ja que l'escutel presentava la formació de teixit embriogènic receptiu per a la transformació (imatge 4B). Vam establir que la concentració d'higromicina per a la selecció del teixit transformat havia de ser de 30 mg per mL i que la millor concentració d'hormones de creixement per a la regeneració de les plantes era una combinació de BA i NAA (imatge 4). Un cop apareixia el teixit verd, el procés de regeneració de la planta seguia els mateixos passos que els protocols utilitzats per a les altres varietats (Saba-Mayoral *et al.*, 2022).



Imatge 4. Detalls del procés de transformació de l'arròs bomba. (A) Embrió madur d'arròs després de sis dies de germinació en medi de proliferació; (B) embrions amb l'escutel a punt per ser bombardejats; (C) call embriogènic resistent a la selecció per higromicina dues setmanes després de la transformació (abans de separar-lo de l'escutel); (D) call en medi de selecció sis setmanes després del procés de transformació (després de dos subcultius de dues setmanes cada un); (E) inici de regeneració de teixit verd a sobre del call embriogènic dues setmanes després de créixer en medi de regeneració amb llum tènue; (F) plàntula regenerant en llum normal i medi de regeneració; (G) planta en medi d'arrelament; (H) planta transgènica creixent en substrat

El fragment de la seqüència RBD de la proteïna S del SARS-CoV-2 (193 residus, N331–V524, YP_009724390.1) la vam copiar de la soca aïllada de Wuhan-Hu-1 NC_045512.2 dipositada en la base de dades d'NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/43740568/>). Vam optimitzar els codons de la seqüència per millorar-ne la producció en arròs. La seqüència va ser sintetitzada



Imatge 5. (A) Disseny de les construccions utilitzades per a l'expressió de la proteïna RBD en arròs. El gen RBD és conduït pel promotor constituït de la ubiquitina-1 de blat de moro i el primer intró (pUbi) o pel promotor D-hordeïna d'ordi (pHord) específic de l'endosperma. Ambdues construccions també presenten el pèptid senyal α -amilasa d'arròs per a dirigir l'RBD a la via secretora i l'acabament de la nopalina sintasa (nos). (B) Comparació de les variants RBD expressades en les plantes fins ara i els nivells màxims d'expressió aconseguits. (C) Primers PCR utilitzats per a amplificar la seqüència RBD i HPT en la confirmació de la integració del transgèn. (D) Seqüència de nucleòtids del gen RBD utilitzat en aquest estudi, que comprèn els residus 331-524 de la soca Wuhan-Hu-1 NC_045512.2

in silico per l'empresa GenScript (Piscataway, NJ, EUA). La seqüència del fragment RBD la vam situar sota el control del promotor constituït de la ubiquitina de blat de moro i el primer intró (Ubi-1) (conduïx l'expressió a tota la planta, que es diu expressió constitutiva) o del promotor D-hordeïna d'ordi específic de l'endosperma (Hord) (conduïx l'expressió només a l'endosperma de la llavor, és a dir, que només trobarem proteïna a les llavors; Marris *et al.*, 1988), i en tots dos casos vam utilitzar el fragment per a l'acabament *nos* d'*Agrobacterium tumefaciens*. La denominació que vam donar a les construccions per a la transformació va ser pUbi-RBD i pHord-RBD (imatge 5).

Avaluació de la producció de la proteïna RBD en fulla i en la resta de teixits de la planta
La presència de proteïna plegada correctament va ser detectada en fulles de nou plantes de les quinze que vam regenerar (un 60 %). La màxima concentració la vam detectar a les fulles de la planta 9 i va ser de $4,05 \pm 0,67 \mu\text{g g}^{-1} \text{fw}$ (taula 1). La presència de proteïna RBD estable va ser confirmada per *western blot*, tal com es veu a la banda que correspon a 23-kDa i, a més a més, no hi ha cap producte de degradació.

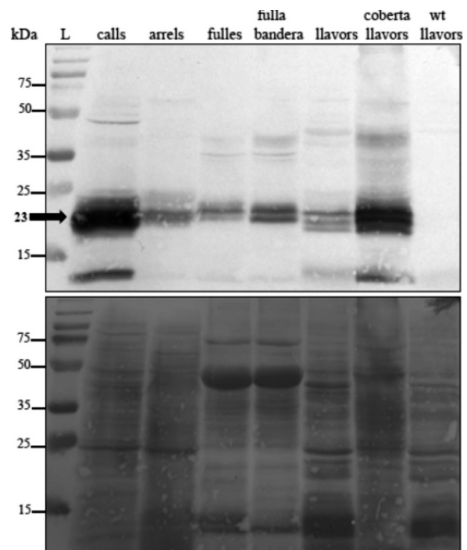
També vam analitzar els extractes d'arrels de les plantes 9, 19 i 26 (pUbi-RBD). La concentració de la proteïna RBD que va ser detectada era de $4,33 \pm 0,56$, $5,25 \pm 0,90$ i $0,35 \pm 0,08 \mu\text{g g}^{-1}$ fw respectivament (taula 1). La proteïna RBD també va ser acumulada en la fulla bandera de la planta 9 ($3,11 \pm 0,33 \mu\text{g g}^{-1}$ fw) i 19 ($4,44 \pm 1,01 \mu\text{g g}^{-1}$ fw) però no a la fulla bandera de la planta 26 (taula 1). La proteïna RBD també es va acumular en la coberta de les llavors de la planta 9 ($3,54 \pm 0,44 \mu\text{g g}^{-1}$ fw), de la planta 19 ($3,36 \pm 0,69 \mu\text{g g}^{-1}$ fw) i de la planta 26 ($0,27 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ fw). L'acumulació de proteïna RBD es va produir d'una forma més elevada als teixits de calls i llavors que als d'arrels i fulles (imatge 6, taula 1).

Comparació dels resultats obtinguts en els teixits d'arròs amb els de *Nicotiana benthamiana*

Fins ara s'ha utilitzat, per a la producció comercial de les vacunes contra la covid-19, la infraestructura existent basada en fermentadors. El cost de producció de les vacunes i equips de detecció per a fer front a aquesta emergència sanitària ha estat molt gran, i avui en dia les vacunes i equips de detecció encara no han arribat massivament als països en desenvolupament. S'han de considerar estratègies de producció assequibles a llarg termini, especialment per a aquest país (Gates, 2020). Ara com ara també puc dir que el desenvolupament clínic amb èxit de la vacunes contra la covid-19 derivades de plantes de *Nicotiana benthamiana* CoVLP, aprovades recentment i produïdes per Medicago i GSK (COVIFEZ®; Ward *et al.*, 2021; Hager *et al.*, 2022), ha demostrat que les plantes ofereixen una estratègia de producció viable en la lluita a llarg termini contra la covid-19. Per tant,

NÚMERO LINEA	NIVELLS D'EXPRESSIÓ ELISA (Producció $\mu\text{g/g fw}$)					
	CALLS	ARRELS	FULLA BANDERA	FULLA	LLAVORS (dw)	COBERTA LLAVORS
9	5.97 ± 0.97	4.33 ± 0.56	3.11 ± 0.33	4.05 ± 0.67	4.47 ± 0.61	3.54 ± 0.44
19	6.88 ± 1.28	5.25 ± 0.90	4.44 ± 1.01	3.80 ± 0.24	5.31 ± 0.50	3.36 ± 0.69
26	0.38 ± 0.05	0.35 ± 0.08	0	0	2.08 ± 0.35	0.27 ± 0.02

Taula 1. Concentració de la proteïna RBD en diferents teixits de les plantes transformades amb la construcció pUbiRBD. La concentració d'RBD en calls, arrels, fulla bandera, fulles ($\mu\text{g g}^{-1}$ per fresc o fw), i llavors ($\mu\text{g g}^{-1}$ per sec o dw) va ser analitzada per ELISA (línies 9, 19 i 26). L'extracció de proteïna es va dur a terme tres vegades (rèpliques biològiques) i cada mostra va ser mesurada tres vegades (rèpliques tècniques). Les dades són la mitjana de totes les rèpliques ($n = 9$) $\pm$ SE



Imatge 6. Anàlisi per western blot dels extractes sense purificar de diferents teixits de la planta 9 que expressa la construcció pUbi-RBD. Les mostres van ser unides a l'anticòs primari anti-RBD i posteriorment detectades amb l'anticòs secundari conjugat amb fosfatasa alcalina. Totes les línies contenen $50 \mu\text{g}$ de proteïna total. La tinció del gel amb Ponceau es mostra com a indicador de càrrega del gel homogènia. El marcador molecular es troba carregat a l'esquerra del gel (L, marcador molecular). La mida esperada de la proteïna RBD és 23 kDa

nosaltres proposem l'ús de la nostra plataforma, basada en arròs, per a la producció del fragment proteic RBD recombinant, tant en la nostra producció local com en el context de les aplicacions als països en desenvolupament. També cal dir que tota aquesta recerca ha estat feta dins del marc del projecte llercovid i finançada totalment per l'AGAUR dins el marc de la crida d'avaluadors de pandèmies de la Generalitat de Catalunya.

Història de l'epidèmia viral, la verola, eradicada gràcies a la vacunació

La majoria dels nascuts abans de l'any 1980 tenim una marca rodona al braç esquerre, vora l'espatlla, però els nascuts després ja no la tenen ni saben què és quan els l'ensenyo. És la marca que ens deixava la vacuna contra la verola, produïda pel *Variola virus*. El metge ens feia una petita incisió que ens alliberava de forma subcutània un inocul del virus de la verola de la vaca (*Vaccinia virus*, Kay *et al.*, 2015). Llavors la ferida cicatritzava d'una forma desigual i quedava la famosa marca rodona, indicativa d'immunitat en l'individu.

La verola va ser una malaltia que va passar d'endèmica a epidèmica. En el passat es va estendre molt al Vell Món i va provocar un col·lapse demogràfic quan els europeus la van dur a Amèrica i Oceania. Sortosament, també fou objecte de la primera vacuna moderna eficaç i, gràcies a la vacunació massiva, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) la va declarar eradicada l'any 1980 (WHO, 1980).

La verola era una malaltia limitada als humans i que es presentava en forma de pústules a la pell. Les persones infectades, o bé morien, o bé se'n recuperaven amb immunitat de per vida. Les cicatrius que deixava eren horribles. La transmissió de la verola es produïa per inhalació del virus de la verola contingut en aerosols provinents de la mucosa oral, nasal o faringia d'una persona infectada a través d'un contacte prolongat cara a cara. També es podia transmetre per contacte directe amb fluids corporals infectats o objectes contaminats (*fomites*), com ara la roba del llit o la roba de vestir. El període d'incubació era d'uns dotze dies, asimptomàtic, seguit d'un període prodromic de començament sobtat, amb febre alta, cefalàlgies, vòmits, convulsions, raquialgies, dispnea, taquicàrdia i erupció prèvia en les zones de flexió. Aquest període, de tres dies de durada, era seguit de l'aparició de l'exantema i, després, d'una millora de tota la simptomatologia. L'exantema verolós evolucionava en forma de màcules, pàpules i vesícules umbilicades; al cinquè dia reapareixia la febre i les vesícules es transformaven en pústules, que, en dessecar-se, romanien en forma de crostes que deixaven una cicatriu permanent (Fenner *et al.*, 1988).

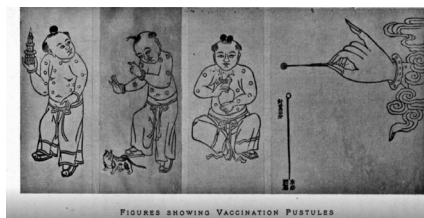
La forma amb més èxit de combatre la verola abans del descobriment de la vacunació va ser la inoculació. La paraula deriva del llatí *inoculare*, que significa 'empeltar'. La inoculació feia referència a la instil·lació subcutània del virus de la verola en individus no immunes. L'inoculador solia utilitzar una llanceta humida amb matèria fresca presa d'una pústula madura d'alguna persona que patia de verola. Tot seguit, el material s'introduïa per via subcutània als braços o les cames de la persona no immune. Els termes *inoculació* i *variolació* sovint s'utilitzaven indistintament. La pràctica de la inoculació sembla que va sorgir de manera independent en diversos països quan les poblacions es van enfrontar a l'amenaça d'epidèmies de verola. No obstant això, la inoculació no estava exempta de riscos. Hi havia la possibilitat que els destinataris poguessin desenvolupar la malaltia i encomanar-la a altres. També els preocupava la transmissió concomitant d'altres malalties, com la sífilis o la tuberculosi (Stearns, 1950).

La inoculació, que també anomenaré *variolació* al llarg del text, era probablement practicada a l'Àfrica, l'Índia i la Xina (imatge 7) molt abans del segle XVIII, quan es va introduir a Europa (Gross i Sepkowitz, 1998).

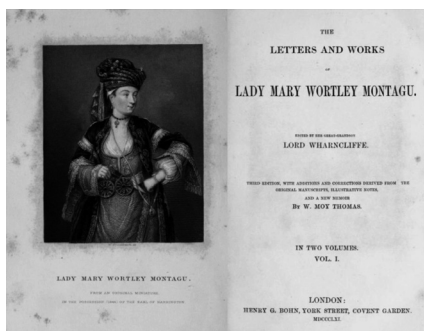
Cap al 1670 els comerciants circassians van introduir la variolació a l'imperi Otomà. Les dones del Caucas, molt demandades a l'harem del sultà d'Istanbul per la seva llegendaria bellesa, eren inoculades de nenes en parts del cos on no es veurien les cicatrius. Probablement, aquestes dones també van introduir la pràctica de la variolació al seu nou país (Barquet i Domingo, 1997).

La promoció continuada de la variolació que va fer l'aristòcrata anglesa Lady Mary Wortley Montague (imatge 8) va ser la responsable de la introducció de la tècnica a Anglaterra. El 1715 Lady Montague va patir una infecció de verola greu que li va desfigurar el rostre. El seu germà de vint anys va morir de la malaltia divuit mesos després. El 1717 el marit de Lady Montague, Edward Wortley Montague, va ser nomenat ambaixador a Turquia. Unes setmanes després de la seva arribada a Istanbul, Lady Montague va escriure a una amiga sobre el mètode de la variolació utilitzat a la cort otomana. Lady Montague estava tan decidida a evitar els estralls de la verola que va ordenar al cirurgià de l'ambaixada, Charles Maitland, d'inocular el seu fill de cinc anys. El procediment d'inoculació es va fer el març de 1718. A la seva tornada a Londres, l'abril de 1721, Lady Montague va demanar a Charles Maitland d'inocular la seva filla de quatre anys en presència de metges de la cort reial (Willis, 1997).

Llavors, a Charles Maitland se li va concedir el permís per fer una prova de variolació a sis presoners a Newgate el 9 d'agost de 1721. Els presoners rebien el favor del rei si se sotmetien a aquest experiment. Diversos professionals de la medicina van observar la demostració. Tots els presoners van sobreviure a l'experiment, i els que més tard es van trobar exposats a la verola es va veure que eren immunes. Un mesos després del primer assaig, Maitland va repetir l'experiment amb infants, de nou amb èxit. Finalment, el 17 d'abril de 1722 Maitland va tractar les dues filles de la princesa de Gal·les, que van quedar immunitzades. Després d'aquest èxit el procediment va obtenir una acceptació general (Stearns, 1950).



Imatge 7. Imatge xinesa que mostra estris utilitzats per a la recollida de material fresc de les pústules.



Imatge 8. Imatge de les «Cartes de Lady Mary Wortley Montagu» del llibre World History Commons, <https://worldhistorycommons.org/letters-lady-mary-wortley-montagu>.

A Europa, on la professió mèdica estava organitzada relativament, el nou mètode de variolació es va difondre ràpidament entre els metges. Atès que hi havia una necessitat molt gran de protegir la població contra la verola, aviat els metges van començar a portar a terme el procediment de forma massiva. Encara que entre un 2% i un 3% de les persones variolades moria de la malaltia, i es podia córrer el risc de produir-se una epidèmia, o que algun variolat pogués patir altres malalties transmeses (per exemple, tuberculosi i sífilis) pel mateix procediment, la variolació va guanyar popularitat ràpidament en la població europea. La taxa de mortalitat associada a la variolació era deu vegades menor que l'associada a la infecció de verola. A la dècada de 1750 alguns prínceps europeus van morir de verola, fet que encara donà més impuls a la variolació. Entre els aristòcrates variolats hi havia l'emperadriu Maria Teresa d'Àustria i els seus fills i nets, Frederic II de Prússia, el rei Lluís XVI de França i els seus fills, i Caterina II de Rússia i el seu fill. El rei Frederic II de Prússia també va fer inocular tots els seus soldats (Hopkins, 1983). De fet, la variolació es va practicar àmpliament a Europa fins als descobriments de Jenner.

El 1757 un nen de vuit anys va ser inoculat amb verola a Gloucester; va ser un dels milers de nens variolats aquell any a Anglaterra. El procediment va ser eficaç: com la majoria d'infants, va desenvolupar un cas lleu de verola i, posteriorment, va ser immune a la malaltia. Es deia Edward Jenner (Barquet i Domingo, 1997).

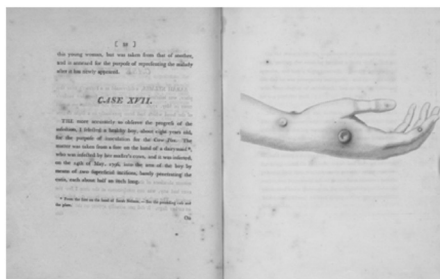
Edward Jenner va néixer el 17 de maig de 1749 a Berkeley, al comtat de Gloucester, i era fill del reverend Stephen Jenner, vicari de Berkeley. Edward es va quedar orfe a cinc anys i se'n va anar a viure amb el seu germà gran. Durant els seus primers anys escolars va desenvolupar un gran interès per la ciència i la natura, que va continuar al llarg de la seva vida. A tretze anys va ser aprenent d'un cirurgià de camp i de l'apotecari a Sodbury, prop de Bristol (Parish, 1968). El seu registre ho demostra, i va ser allà on Jenner va sentir dir a una jove munyidora: «No tindrè mai verola perquè he patit la verola de la vaca. Mai tindrè una cara lletja per les marques». De fet, era una creença comuna que les munyidores estaven protegides de la verola d'alguna manera.

L'interès de Jenner pels efectes protectors de la verola bovina va començar durant el seu aprenentatge amb George Harwicke el 1796. Seria el primer pas del llarg procés pel qual la verola seria erradicada totalment. Jenner havia escoltat durant molts anys les històries que les munyidores estaven protegides de la verola naturalment després d'haver patit la verola bovina. Reflexionant-hi, va concloure que la verola bovina no només protegia contra la verola, sinó que també es podia transmetre de persona a persona com a mecanisme deliberat de protecció. El maig de 1796 va atendre a la consulta una jove munyidora, la Sarah Nelms, que tenia lesions a les mans i els braços a causa d'una infecció de verola vacuna (imatge 9). El 14 de maig de 1796, utilitzant la matèria de les lesions de la Sarah, va inocular un nen de vuit anys, James Phipps, que era fill del seu jardiner (imatge 10). Posteriorment, el James va desenvolupar una febre lleu i molèsties a les axil·les. Nou dies després del procediment sentia molt fred i havia perdut la gana, però l'endemà estava molt millor. El juliol de 1796 Jenner va inocular el James de nou, aquesta vegada amb matèria d'una lesió fresca de verola humana, i no va desenvolupar cap malaltia. Jenner va concloure que la protecció que el James tenia contra la verola era total (Willis, 1997). El 1797 Jenner va enviar una breu comunicació a la Royal Society de Londres en què descrivia el seu experiment i observacions. Malgrat això, el manuscrit va ser rebutjat. El 1798, després

d'haver afegit uns quants casos més al seu experiment inicial, va publicar ell mateix un llibret titulat *Una investigació sobre les causes i els efectes de la Variolae vaccinae, una malaltia descoberta en alguns dels comtats occidentals d'Anglaterra, especialment Gloucestershire, i coneguda amb el nom de verola de vaca* (Willis, 1997; Winkelstein, 1992). L'etimologia llatina de vaca, *vacuna*, va portar Jenner a anomenar aquest nou procediment *vacunació*.

A final del segle XIX es va veure que la vacunació per si mateixa no conferia immunitat per a tota la vida i que era necessària una revacunació posterior. La mortalitat per verola havia disminuït, però l'aparició d'epidèmies demostrava que la malaltia encara no estava controlada.

A la dècada de 1950 es van implementar diverses mesures de control, i la verola va ser eradicada a moltes zones d'Europa i del nord d'Amèrica. El procés d'eradicació mundial de la verola es va posar en marxa quan el 1958 l'Assemblea Mundial de la Salut va rebre un informe de les conseqüències catastròfiques de la verola a seixanta-tres països. Durant anys, cada país portava a terme les seves pròpies campanyes de vacunació, fins que el 1958 Víktor Jdànov, el viceministre de Salut de la Unió Soviètica, va proposar a l'Assemblea Mundial de la Salut una iniciativa global conjunta per eradicar la verola. La proposta va ser aprovada el 1959 amb el nom de Resolució WHA11.54. L'eradicació de la malaltia, que aleshores afectava gairebé dos milions de persones cada any, es va transformar en el principal objectiu de l'OMS. L'any 1967 es va iniciar una campanya mundial sota el tutela de l'OMS, i finalment es va aconseguir l'eradicació de la verola, l'any 1977. El 8 de maig de 1980 la XXXIII Assemblea de l'OMS va acceptar l'*Informe final de la Comissió Global per a la Certificació de l'Eradicació de la Verola*, va anunciar que el món estava lliure de verola i va recomanar que tots els països abandonessin la vacunació per aquesta malaltia (WHO, 1980).



Imatge 9. Gravats d'artista desconegut de la mà de la Sarah Nelmes (1798) amb una pústula de verola de vaca (*Vaccinia virus*). La imatge pertany a la Posner Memorial Collection, Carnegie Mellon University Libraries, Special Collections



Imatge 10. Jenner vacunant el nen James Phipps. És una pintura a l'oli d'Ernest Board (1877-1934)

Referències

- BARQUET, N., & DOMINGO, P. (1997) Smallpox: the triumph over the most terrible of the ministers of death. *Annals of Internal Medicine* 127(8 Pt 1), 635-642.
- CAPELL, T., TWYMAN R.M., ARMARIO-NAJERA, V., MA, J.K.-C., SCHILLBERG, S., & CHRISTOU, P. (2020) Potential applications of plant biotechnology against SARS-CoV-2. *Trends Plant Sciences* 25, 635-643.
- FENNER, F., HENDERSON, D.A., ARITA, I., JEDEZ, Z., & LADNYI, I.D. (1988) Small pox and its eradication. Published by WHO ISBN: 92 4 156440 6
- GATES, B. (2020) Responding to Covid-19 – A once in a century pandemic? *The New England Journal of Medicine* 328, 1677-1679.
- GROSS, C.P., & SEPKOWITZ, K.A. (1998) The myth of the medical breakthrough: smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered. *International Journal Infectious Diseases* 3, 54-60.
- HAGER, K.J., PÉREZ-MARC, G., GOBEIL, P., DIAZ, R.S., HEIZER, G., LLAPUR, C., MAKARKOV, A.I., VASCONCELLOS, E., PILLET, S., *et al.* (2022) Efficacy and safety of a recombinant plant-based adjuvanted Covid-19 vaccine. *The New England Journal Medicine* 386, 2084-2096.
- HERRERA-ESTRELLA, L., DEPICKER, A., VAN MONTAGU, & M., SCHELL, J. (1983). Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209-213.
- HOPKINS, D.R. (1983) *Princes and Peasants: Smallpox in History*. Chicago: University of Chicago Press.
- KAY, P., HWANG, Y., BUSHMAN, F.D., & VAN DUYN, G.D. (2015) Insights from the Structure of a Smallpox Virus Topoisomerase-DNA Transition State Mimic. *Structure* (London, England: 1993). U.S. National Library of Medicine.
- MA, J.K.-C., DRAKE, P.M., & CHRISTOU, P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics* 4, 794-805.
- MARRIS, C., GALLOIS, P., COPLEY, J., & KREIS, M. (1988) The 5' flanking region of a barley B hordein gene controls tissue and developmental specific CAT expression in tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 10, 359-366.
- MIR-ARTIGUES, P., TWYMAN, R.M., ALVAREZ, D., CERDA-BENASSER, P., BALCELLS, M., CHRISTOU, P., & CAPELL, T. (2019) A simplified techno-economic model for the molecular pharming of antibodies. *Biotechnology Bioengineering* 116, 2526-2539.
- NICHOLSON, L., GONZALEZ-MELENDE, P., VAN DOLLEWEED, C., TUCK, H., PERRIN, Y., MA, J.K.-C., FISCHER, R., CHRISTOU, P., & STÖGER, E. (2005) A recombinant multimeric immunoglobulin expressed in rice shows assembly-dependent subcellular localization in endosperm cells. *Plant Biotechnology Journal* 3, 115-127.
- PARISH, H.J. (1968) *Victory with Vaccines: The Story of Immunization*. Edinburgh: E & S Livingstone.
- PIETSCHEMANN, J., VOEPEL, N., VOSS, L., RASCHKE, S., SCHUBERT, M., KLEINES, M., KRAUSE, H.J., SHAW, T.M., SPIEGEL, H., & SCHROEPER, F. (2021) Development of fast and portable frequency magnetic mixing-based serological SARS-CoV-2-Specific antibody detection assay. *Frontiers Microbiology* 12, 643275.
- RAMESSAR, K., CAPELL, T., & CHRISTOU, P. (2008a) Molecular pharming in cereal crops. *Phytochemical. Reviews* 7, 579-592.
- RAMESSAR, K., RADEMACHER, T., SACK, M., STADLMANN, J., PLATIS, D., STIEGLER, G., LABROU, N., ALTMANN, F., MA, J.K.-C., STÖGER, E., CAPELL, T., & CHRISTOU, P. (2008b) Cost-effective production of a vaginal protein microbicide to prevent HIV transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 105, 3727-3732.
- NAQVI, S., ZHU, C., FARRE, G., RAMESSAR, K., BASSIE, L., BREITENBACH, J., PEREZ CONESA, D., ROS, G., SANDMANN, G., CAPELL, T., & CHRISTOU, P. (2009) Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci of USA* 106, 7762-7767.
- SABA-MAYORAL, A., BASSIE, L., CHRISTOU, P., & CAPELL, T. (2022) Development of a facile genetic transformation system for the Spanish elite rice paella genotype Bomba. *Transgenic Research* 31, 325-340.
- SCOTT, E.L. (1974) Edward Jenner FRS and the cuckoo. *Notes and Records of the Royal Society* 28, 235-240.
- STEARNS, R.P. (1950) Remarks upon the introduction of inoculation for smallpox in England. *Bull Hist Med* 24, 103-122.
- VAMVAKA, E., TWYMAN, R.M., MURAD, A., MELNIK, S., THE, A., ARCALIS, E., ALTMANN, F., STÖGER, E., RECH, E., MA, J.K.-C., CHRISTOU, P., & CAPELL, T. (2016a) A recombinant HIV-neutralizing antibody produced in rice endosperm accumulates predominantly as an aglycosylated derivative with enhanced neutralizing activity. *Plant Biotechnology Journal*. 14, 97-108.
- VAMVAKA, E., ARCALIS, E., RAMESSAR, K., EVANS, A., O'KEEFE, B.R., SHATTOCK, R.J., MEDINA, V., STÖGER, E., CHRISTOU, P., & CAPELL, T. (2016b) Rice endosperm is cost-effective for the production of recombinant griffithsin with potent activity against HIV. *Plant Biotechnology Journal* 6, 1427-1437.
- VAMVAKA, E., EVANS, A., RAMESSAR, K., KRUMPE, L.R.H., SHATTOCK, R.J., O'KEEFE, B.R., CHRISTOU, P., & CAPELL, T. (2016c) Cyanovirin-N produced in rice endosperm offers effective pre-exposure prophylaxis against HIV-1BaL infection in vitro. *Plant Cell Reports* 35, 1309-1319.

VAMVAKA, E., FARRÉ, G., MOLINOS-ALBERT, L., EVANS, A., CANELA-XANDRI, A., TWYMAN, R., CARRILLO, J., ORDÓÑEZ, R.A., SHATTOCK, R., O'KEEFE, B., CLOTET, B., BLANCO, J., KHUSH, G., CHRISTOU, P., & CAPELL, T. (2018) Unexpected synergistic HIV neutralization by a triple microbicide produced in rice endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 115, E7854-E7862.

WARD, B.J., GOBEIL, P., SÉGUIN, A., ATKINS, J., BOULAY, I., CHARBONNEAU, P.Y., COUTURE, M., D'Aoust, M.A., DHALIWALL, J., FINKLE, C., HAGER, K., MAHMOOD, A., MAKARKOV, A., CHENG, M.P., PILLET, S., SCHIMKE, P., ST-MARTIN, S., TRÉPANIÉ, S., & LANDRY, N. (2021) Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *Nature Medicine* 27, 1071-1078.

WARD, B.J., MAKARKOV, A., SÉGUIN, A., PILLET, S., TRÉPANIÉ, S., DHALIWALL, J., LIBMAN, M.D., VESIKARI, T., & LANDRY, N. (2020) Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18-64 years) and older adults (≥65 years): two multicentre, randomised phase 3 trials. *Lancet* 396, 1491-1503.

WILLIS, N.J. (1997) Edward Jenner and the eradication of smallpox. *Scottish Medical Journal* 42, 118-121.

WINKELSTEIN, W. JR (1992) Not just a country doctor: Edward Jenner, scientist. *Epidemiology Reviews* 14, 1-15.

WHO (World Health Organization). Global Commission for Certification of Smallpox Eradication (1980). The Global Eradication of Smallpox: Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication. Geneva: World Health Organization.

