

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/288835351>

Ghiorghita G., Organismele modificate genetic si implicatiile lor. Edit. "Pim", Iasi, 2015, 144p.

Book · October 2015

CITATIONS

0

READS

3,480

1 author:



Gogu Ghiorghita

University of Bacau

44 PUBLICATIONS 56 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Birds: phylogeny and population genetics [View project](#)



European bison [View project](#)

GOGU GHIORGIȚĂ

**ORGANISMELE MODIFICATE GENETIC
ȘI IMPLICAȚIILE LOR**



editura pim
Iași, 2015

REFERENȚI ȘTIINȚIFICI

Prof. univ dr. Octavian Popescu – Membru titular al Academiei Române

Prof. univ. dr. Natalia Roșoiu – membru titular al Academiei Oamenilor
de Știință din România

editura pim

Editură acreditată CNCSIS – 66/2010

Șoseaua Ștefan cel Mare și Sfânt nr. 4, Iași – 700497

Tel.: 0730.086.676, 0732.430.407, 0733.004.203

Fax: 0332.440.715

email: editura@pimcopy.ro

www.pimcopy.ro

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

GHIORGIȚĂ, GOGU

Organismele modificate genetic și implicațiile lor / Gogu Gheorghiză. -

Iași : PIM, 2015

ISBN 978-606-13-2710-2

631.528.1

575.224

Coperta și așezarea în pagină: dr. biolog Mihaela Hârțan

Rezumatul în engleză: lector dr. Diana Elena Mattei

*In memoria unui mare savant,
Johann Gregor Mendel,
primul si cel mai ilustru dintre geneticieni,*

cu ocazia implinirii a 150 de ani de la prezentarea in cadrul Societatii de Istorie Naturala din Brno a lucrarii sale "Versuche über Pflanzen Hybriden" ("Cercetari asupra hibrizilor la plante"), care a marcat o noua etapa in descifrarea tainelor viului.

CUPRINS

Prefață.....	I
Cuvânt înainte.....	1
Introducere.....	5
1. Enzimele de restricție și modificare	10
2. Vectori folosiți în transferul genelor	15
3. Unele realizări în domeniul transgenezei.....	19
3.1. Realizări ale transgenezei la microorganisme, fungi filamentoși și drojdii	22
3.1.1. Obținerea de proteine recombinant cu ajutorul bacteriilor manipulate genetic	22
3.1.2. Obținerea de proteine recombinant cu ajutorul fungilor filamentoși	27
3.1.3. Obținerea de proteine recombinant cu ajutorul drojdiilor	32
3.2. Realizări ale transgenezei la animale.....	36
3.2.1. Sisteme celulare animale folosite în producerea de proteine recombinant	48
3.3. Unele realizări ale transgenezei la plante	60
3.3.1. Producerea de către plantele transgenice a unor substanțe de interes medical	78
4. Considerații comparative privind eficiența diverselor sisteme de expresie a proteinelor recombinant.....	89
5. Valorificarea organismelor modificate genetic și a produselor lor.....	94
6. Reglementarea organismelor și culturilor MG, marcarea produselor MG	99
7. Controverse privind impactul culturilor și alimentelor MG asupra sănătății mediului și omului	107
Referințe bibliografice	127
Rezumat.....	134

C O N T E N T

Preface.....	I
Foreward	1
Introduction	5
1. The restriction and modification enzymes	10
2. Vectors used in gene transfer	15
3. Some achievements in the field of transgenesis	19
3.1. Accomplishments of the transgenesis in bacteria, filamentous fungi, and yeasts.....	22
3.1.1. Recombinant proteins obtained using transgenic bacteria.....	22
3.1.2. Recombinant proteins produced by filamentous fungi.....	27
3.1.3. Recombinant proteins obtained using transgenic yeasts.....	32
3.2. Accomplishments in the animal transgenesis	36
3.2.1. Animal cellular systems used for recombinant proteins production	48
3.3. Some achievements in the plant transgenesis	60
3.3.1. Production by transgenic plants of medical interest proteins.....	78
4. Comparative considerations concerning the efficiency of different recombinant proteins expression systems.....	89
5. The capitalization of genetic modified organisms and their products.....	94
6. The regulation of genetic modified organisms and crops, and labeling of their products.....	99
7. Controversies in the use of GM crops and foods	107
References.....	127
Summary	134

P R E F A Ț Ă

Secolul al XXI-lea, cel puțin în prima sa jumătate, va fi al biologiei, în general, și al geneticii și genomicii, în particular. În a doua jumătate a secolului al XX-lea a apărut ingineria genetică (*genetic engineering*) sau tehnologia ADN-ului recombinat (*recombinant DNA technology*) ca un ansamblu de tehnici neconvenționale cu ajutorul cărora s-au obținut **organisme modificate genetic** (OMG), prin formarea și încorporarea de noi combinații de material genetic exogen, destinat să aducă un caracter nou favorabil sau să înlocuiască o genă anormală. Această nouă abordare, anticipată și imaginată în linii mari de pionierii biologiei moleculare, stârnește încă multe dezbateri mai ales când se ajunge la detalii.

Orice microorganism, plantă sau animal care a suferit un transfer de gene și a cărui informație genetică a fost modificată, conferindu-i proprietăți noi diferite de cele proprii prin tehnici de inginerie genetică, devine un organism modificat genetic. Caracteristica esențială acestei tehnologii constă în posibilitatea depășirii barierelor de specie. Gena nou-transferată încorporată și exprimată în genomul gazdei este o transgenă. Astfel de OMG sunt capabile să sintetizeze produse farmaceutice (insulină, somatostatina, hormon de creștere uman, interferoni, factori de coagulare, activator tisular al plasminogenului, eritropoietină, interleukine etc) sau pot fi utilizate pentru obținerea de vaccinuri noi. De asemenea, în prezent există microorganisme modificate genetic care pot să degradeze o gamă largă de hidrocarburi din țigări și plante modificate genetic rezistente la dăunători, la secetă sau îngheț, la erbicide sau care au o valoare nutritivă superioară.

Cum era și firesc, experimentele de recombinare genetică in vitro și produsele rezultate au indus teama de modificare a ordinii naturale a proceselor de evoluție, foarte delicat controlate de-a lungul milioanelor de ani. „Partizanii” noii tehnologii au demonstrat că însăși evoluția naturală a creat o serie de agenți patogeni foarte periculoși (care produc ciurma, variola, holera, iar mai recent febra de Lhassa, virusul Marburg, SIDA, Ebola etc.). În general, avantajele noilor tehnologii sunt mult mai mari decât riscurile potențiale, dar acestea impun respectarea unor norme de securitate corelate cu

*particularitățile organismelor reactante și a celor nou create. Riscul organismelor modificate genetic se referă la posibilitatea ca, în condiții particulare de expunere, acestea ar produce efecte dăunătoare asupra mediului, asupra altor organisme și în special asupra omului. Prin urmare, au fost elaborate norme naționale și internaționale de evaluare științifică a riscurilor în comparație cu organismele nemodificate, cu influențe asupra agriculturii, silviculturii și horticulturii, sănătății etc, precum și asupra problemelor de ordin socio-economic. Între efectele negative potențiale sunt citate: răspândirea unor gene de rezistență la erbicide și la insecte dăunătoare transmise de la plantele de cultură la plantele sălbatice cu apariția unor „buruieni” necontrolabile, moartea unor insecte polenizatoare, apariția de plante cu caracter invaziv, crearea de dezechilibre ecologice, afectarea gravă a anumitor specii, toxicitatea ridicată, alergenicitatea dar și aspecte mai grave ca apariția de patogeni noi, de arme biologice (bioterrorism) și chiar scenarii vizând manipularea deliberată a unor gene umane pentru a induce modificări de comportament. Aceste temeri au generat conceptul de **biosecuritate**, prin care autoritățile statale formulează norme riguroase privind producerea, manipularea, circulația transfrontalieră și utilizarea **organismelor modificate genetic** (Zarnea și Popescu, 2011).*

Până în prezent, nu există date științifice validate pe plan mondial, care să dovedească un impact negativ asupra sănătății umane sau animale sau asupra mediului ambiantal produselor provenite de la plantele modificate genetic. Mai mult, în perioada 1996-2013, aceste culturi au contribuit la securitatea alimentară, la dezvoltarea durabilă și la protecția mediului. În sprijinul acestor afirmații vine și raportul EASAC (*European Academies Science Advisory Council*) din 2013 (*Planting the future: opportunities and challenges for sustainable crop protection*, EASAC Policy Report, Halle, German National Academy of Sciences Leopoldina). O evaluare a peste 2000 de lucrări științifice din domeniul biotehnologiilor, efectuată de *Swiss National Science Foundation* (2012), confirmă că nu există riscuri nici pentru mediu și nici pentru sănătate. De asemenea, o declarație a Consiliului de Administrație al Asociației Americane pentru Progresul Științei (AAAS, 2012) reafirmă că plantele modificate genetic sunt cele mai testate culturi din lanțul de aprovizionare cu alimente. O meta-analiză din 2014 (*A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops*), bazată pe 147 de lucrări științifice din domeniul biotehnologiilor publicate în ultimii 20 de ani, demonstrează că prin cultivarea plantelor modificate genetic s-a redus cu 37% cantitatea de pesticide, productivitatea a crescut cu 22%, iar profiturile fermierilor au crescut cu 68%.

Cercetarea științifică trebuie să mențină și să dezvolte capacitățile sale de expertiză, inclusiv prin experimentare. În laboratoare se pregătește o nouă generație de PMG care are la bază „editarea genomului” (*genome editing*) cu ajutorul nucleazelor controlate de ARN (*RNA-guided nucleases*). Astfel nu se mai apelează la ADN străin, ci la modificarea propriilor gene cu ajutorul unor tehnici noi de biologie moleculară (ZFNs = *Zinc Finger Nucleases*, TALENs = *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* sau CRISPR = *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*).

În acest context, monografia domnului prof. univ. dr. Gogu GHIORGHIȚĂ, **Organismele modificate genetic și implicațiile lor**, este foarte binevenită. Autorul abordează cu obiectivitate, de la simplu la complex, aspecte esențiale ale subiectului abordat. Volumul cu o iconografie îngrijită și elaborată și o ținută grafică deosebită, exemplar din toate punctele de vedere, este foarte bine sistematizat și structurat pe șapte capitole (în afară de introducere și cele peste 150 de referințe bibliografice):

1. *Enzimele de restricție și modificare*
2. *Vectori folosiți în transferul genelor*
3. *Unele realizări în domeniul transgenezei*
 - 3.1. *Realizări ale transgenezi la microorganismele, fungi filamentoși și drojdii*
 - 3.2. *Realizări ale transgenezei la animale*
 - 3.3. *Unele realizări ale transgenezei la plante*
4. *Considerații comparative privind eficiența diverselor sisteme de expresie a proteinelor recombinante*
5. *Valorificarea organismelor modificate genetic și a produselor lor*
6. *Reglementarea organismelor și culturilor MG, marcarea produselor MG*
7. *Controverse privind impactul culturilor și alimentelor MG asupra sănătății mediului și omului.*

Prin întreaga problemă abordată, monografia **Organismele modificate genetic și implicațiile lor** este foarte utilă biologilor, specialiștilor consacrați din domeniul biotehnologiilor sau din diferite domenii biomedicale, dar și specialiștilor, tinerilor cercetători și studenților preocupați de tehnologia acizilor nucleici. Grija pentru detaliu, interpretarea logică a datelor experimentale, corelarea structură-funcție etc, dau acestei lucrări un caracter original cu totul deosebit și o ținută științifică remarcabilă. În acest fel, domnul prof. univ. dr. Gogu GHIORGHIȚĂ aduce o contribuție de marcă la îmbogățirea

patrimoniului științific național în domeniul biotehnologiilor moleculare. Recomand cu căldură lucrarea tuturor celor interesați să se introducă în acest domeniu fascinant și fecund al biologiei și geneticii moderne.

București, 8 septembrie 2015

Acad. prof. dr. Octavian POPESCU

CUVANT INAINTE

Doar rostirea termenului GENETICA îi face pe unii dintre noi să vibreze, să se întrebe, oare ce minuni s-au mai produs între timp în acest domeniu al științei?! Genetica își are obârșia în urma cu 150 de ani când, un nume devenit celebru peste ani (și nu în timpul vieții, cum ar fi meritat și s-ar fi cuvenit) - Johann Gregor Mendel, avea să descopere legile după care se transmit caracterele de la părinți la urmași - legile eredității. Pașii acestui domeniu, redescoperit în zorii secolului al XX-lea, au fost o vreme domoali, întocmai ca ai unui copil care mai întâi învătă să meargă, apoi să vorbească, devine adolescent și deodată atinge maturitatea și începe să-și arate potențialul.

La începutul veacului trecut s-a stabilit că toate caracterele unui organism, oricare ar fi el, sunt determinate de niste structuri fine dispuse pe cromosomi, denumite gene, că unele gene se transmit în lantuit, că între cromosomii omologi pot avea loc schimburi de gene prin crossing-over, că aceste gene se pot schimba prin fenomenul de mutație și da naștere la variante ale aceleiași gene (alele), că prin intermediul unor factori fizici și chimici se pot produce mutații artificiale etc. Nu se știa însă care este substratul molecular al eredității, care este substanța din organisme responsabilă de transmiterea caracterelor. În 1940, în urma unor experiențe de transformare genetică la pneumococ, se descoperea că acizii nucleici sunt cei însărcinați cu aceasta "misiune". Era o cucerire importantă, care puneau bazele geneticii moleculare, dar pasul decisiv încă nu fusese făcut. Nu se știa care este structura acizilor nucleici și prin ce mecanism reușesc ei să dicteze caracterele unui organism viu.

Anul 1953 se dovedește de bun augur în acest sens. Un american de doar 26 de ani (valoarea nu-și spune cuvântul neapărat cu trecerea anilor) și un britanic, ceva mai în vârstă, stabilesc care sunt componentii ce alcătuiesc acizii nucleici, cum se assemblează ei în aceste macromoleculă (structura lor) și mai ales modalitatea prin care se replică acidul dezoxiribonucleic (ADN) pentru că fiecare celulă care se divide să primească aceeași cantitate de material genetic. A fost, după părerea noastră, momentul care a marcat trecerea geneticii de la faza ei de "copilarie" și "adolescență", la cea a deplinei "maturități".

După acest eveniment crucial, onorat cu un premiu Nobel, într-un interval de timp relativ scurt, s-a derulat o adevărată avalanșă de

cuceriri de marca in genetica moleculara: s-a aflat structura genelor, tipurile de ARN si rolul lor in celula, codul genetic, s-a produs sinteza artificiala a genelor, s-a aflat mecanismul sintezei proteinelor si s-a reusit sinteza lor artificiala, s-a descoperit arsenalul de enzime care participa la toate aceste procese, modul cum circula informatia genetica in celula, s-au descoperit unele enzime esentiale pentru ingineria genetica (transcriptaza inversa, enzimele de restrictie, ADN-ligaza) etc multe dintre aceste cuceriri fiind de asemenea onorate cu premii Nobel. Se deschidea o noua pagina, o adevarata revolutie in domeniul biotehnologiilor.

Descoperirea tehnologiei ADN recombinant la inceputul anilor 1970, care a permis transferul de gene intre cele mai diverse organisme, apartinand chiar la regnuri diferite, a adus cu sine multe sperante, certitudini, dar si serioase ingrijorari. Cu siguranta nu sunt primul care am gandit astfel, dar operatiunile de transgeneza si de clonarea somatica (in special la animale) au adus omul in postura de a se juca de-a Dumnezeu. E bine, e rau ?! E si bine, e si rau, am zice noi.

E bine daca ne gandim la faptul ca poate, in sfarsit, omul a gasit calea de a interveni in corectarea genelor "bolnave", pentru a curma - intr-o buna zi suferinta unor semeni de-ai nostri, posesori ai unor astfel de gene; ca diverse specii de organisme (microbi, drojzii, fungi, plante, animale) se pot constitui in "biofabrici" de productie a unor proteine recombinant de interes medical; pot fi "inzestrate" plantele de cultura si animalele de ferma cu caracterele de productie si calitate dorite de amelioratori intr-un mod tintit si intr-un timp mult mai scurt decat prin metodele traditionale; prin mijlocirea unor organisme transgenice (bacterii, levuri, fungi filamentosi) se pot obtine o serie de substante utile omului (enzime, bioplasticuri etc), se pot pune in valoare terenuri improprii agriculturii (saraturate, desertice, poluate cu metale grele etc); prin intermediul plantelor de cultura transgenice se poate asigura combaterea unor boli la plante, dar si reducerea poluarii mediului cu unele pesticide (insecticide, erbicide); practicarea acestei tehnologii contribuie si la elucidarea unor aspecte teoretice din domeniul biologiei moleculare si a geneticii etc.

Exista insa multe temeri si rezerve din partea unei parti a opiniei publice si in special a activistilor de mediu, tocmai din cauza potentialului imens al acestei tehnologii. Unii considera ca ele ar pune in pericol sanatatea omului si a mediului; se invoca posibilitatea ca prin cultivarea de plante transgenice rezistente la erbicide si pentru rezistentia la unii daunatori sa se dezvolte "superburuieni" si respectiv "supergandaci"; sunt temeri ca genele de rezistentia la antibiotice, folosite ca markeri selectabili in actiunile de transgeneza, sa nu se

transfere în microbiota intestinală a omului; sunt de asemenea temeri ca produse ale culturilor Bt ar putea fi toxice pentru unele insecte; sunt îngrijorări și în legătura cu organismele acvatice transgenice care eliberate în mediu ar putea altera ecosistemele; inamicii culturilor MG consideră ca acestea ar atenta la conservarea biodiversității; împotriva proliferării organismelor transgenice sunt invocate chiar și motive de ordin etic, faptul că genotipurile transgenice nu ar fi putut apărea pe cale naturală, că operațiile de transgeneză reprezintă o manipulare a vieții și o violare a drepturilor speciilor etc.

Desigur că unele din îngrijorările de mai sus nu sunt chiar lipsite de temei, mai cu seamă că de la obținerea și valorificarea sub diverse forme a organismelor transgenice a trecut poate prea puțină vreme ca să ne pronunțăm asupra efectelor lor pe termen lung. De aceea, trebuie ca în experiențele de transgeneză să se manifeste mult discernământ și prudență și să se exercite un control continuu și riguros asupra lor pentru a se evita eventuale evenimente genetice nedorite.

Ma număr printre adepții aplicării transgenezei la organismele vii, pentru că sunt conștient de marile avantaje ale folosirii acestei tehnologii pentru omeni și de faptul că științei nu-i pot fi impuse opreliști. Ma bizui totodată pe onestitatea și moralitatea oamenilor de știință, care vor putea rezista presiunilor la care vor fi supuși din partea companiilor biotehnologice și a mediului de afaceri care urmăresc adeseori profitul cu orice pret. Admit că sunt riscuri, că sunt posibile și unele esecuri sau accidente genetice - datorate operațiilor de transgeneză, dar sunt convins că cercetătorii vor găsi întotdeauna soluții pentru a ieși din impas.

Am gândit această lucrare ca pe un instrument de inițiere în ingineria genetică, un fel de ABC al domeniului, încercând să descriez - pe cât mi-a stat în putință, pentru o masă cât mai largă de cititori, unele din tainele lui, metodele, tehnicile, notiunile și termenii cu care operează. Este o invitație adresată cititorilor avizați și neavizați de a se informa și familiariza dintr-o lucrare de mici dimensiuni, pe care am încercat să-o concep să fie cât mai accesibilă, cu unele din problemele pe care le ridică transgeneza, asupra potențialului sau miraculos, a avantajelor și dezavantajelor practicării ei, a controverselor, a unor "legende" starnite de această tehnologie de varf din domeniul biologiei. În ce măsură am reușit în intenția mea, vor decide doar cei ce vor avea curiozitatea să deschidă paginile acestei cărți.

*Mi-am permis sa dedic aceasta lucrare - in semn de omagiu, imensa pretuire si profund respect, memoriei unui mare savant, un cercetator iscusit, care si-a depasit cu mult epoca prin intuitia si clarviziunea sa, care m-a cucerit de la primul contact cu opera sa, pe cand eram inca student, si care continua sa ma uimeasca si astazi cu metoda lui experimentală, cu modelul lui de gandire si modul in care a interpretat rezultatele experientelor sale de hibridare la plante, cu genialitatea sa - modestul prelat **Johann Gregor Mendel**, primul genetician al lumii. Personal, il consider pe Mendel una dintre cele mai stralucite minti pe care le-a avut omenirea. Neinteles in epoca, dar constient de valoarea operei sale, daca s-ar afla acum printre noi, cu siguranta ar fi mandru ca a fost pe deplin confirmat dupa ce a trecut in lumea umbrelor, dar uimit (chiar si el) - constatand unde au dus si au ajuns, dupa 150 de ani, cercetarile in domeniul initiat de el.*

Adresez calde multumiri domnului academician profesor dr. Octavian Popescu si doamnei prof. univ. dr. Natalia Rosoiu pentru onoarea ce mi-au facut-o de a lectura si aprecia aceasta carte si de a accepta sa-i fie refereni stiintifici.

La realizarea acestei lucrari, asa cum se prezinta ea la final, mi-au fost alaturi lector dr. Diana Elena Maftei si dr. biolog Mihaela Hartan, carora le aduc sincere si colegiale multumiri.

20.07.2015

Autorul

Introducere

Puțini sunt cred cei care își imaginau în 1953 - în momentul descoperirii structurii acidului dezoxiribonucleic (ADN) și a modului de replicare a lui, ce impact uriaș va avea acest al doilea eveniment din biologia moleculară (după stabilirea faptului că acizii nucleici sunt moleculele eredității, în 1940) asupra cursului biologiei (și a domeniilor ei aplicative), că într-un timp extrem de scurt (ceva mai mult de două decenii), omul va fi capabil să schimbe unele caractere ale organismelor vii, intervenind asupra structurilor eredității în mod țintit. Este adevărat că, încă la începutul secolului trecut specialiștii reușiseră să modifice unitățile eredității (genele) prin mutageneză experimentală, schimbările (mutațiile) induse și caracterele controlate de ele fiind însă rodul întâmplării. Prin intermediul factorilor mutageni se pot obține doar variante (alele) ale genelor dintr-un organism și nu se pot achiziționa gene (caractere) cu totul noi, nespecifice organismului, cum e cazul ingineriei genetice, capabilă să transfere gene (caractere) de la un organism la altul (din aceeași specie sau din specii diferite, aparținând chiar la regnuri diferite). Considerăm de altfel, într-o exprimare plastică, dar sugestivă, că tehnicile ingineriei genetice și ale clonării somatice (la animale, în special) aveau să aducă omul în postura de *"a se juca de-a D-Zeu"*.

O suită de succese înregistrate de genetica moleculară în deceniile 6-7 ale secolului trecut, dintre care am amintit deja, descifrarea structurii ADN și a modelului său de replicare, a ARN, tipurilor de ARN și rolului fiecăruia, a codului genetic, transcripției și translației informației genetice, a arsenalului de enzime ce participă la aceste procese, a transcriptazei inverse, enzimelor de restricție și modificare, a ADN-ligazei, a sintezei artificiale a genelor, a tehnologiei ADN-recombinant etc, au permis trecerea la operații de inginerie genetică pe organismele vii. Primii pași în elaborarea tehnologiei ADN recombinant au fost posibili prin descoperirea către sfârșitul anilor 1960 a ADN-ligazei (de către americanii Martin Gellert și colaboratorii săi) - enzimă capabilă să reunească fragmente separate de ADN, și apoi a enzimelor de restricție (de către elvețianul Werner Arber și colaboratorii), enzime capabile să secționeze molecula de ADN (Pray, 2008),[82]. Deși termenul de inginerie genetică (sau manipulare genetică) este folosit frecvent pentru a desemna tehnicile folosite în transferul de gene străine între organismele vii, el are o sferă de cuprindere ceva mai largă, incluzând de exemplu și alte tehnici biotehnologice cum sunt clonarea la animale și om [139].

Transferul de gene de la un organism la altul poate conduce la obținerea de organisme *cisgenice* - în cazul în care organismele sunt compatibile sexual) și *transgenice* - dacă organismele sunt incompatibile sexual). Organismele cisgenice pot conține una sau mai multe *cisgene* (dar nu și transgene), cisgenele respective incluzând și intronii, fiind flancate de secvențele lor promotor și terminator naturale, cu orientare normală. În cazul organismelor transgenice, *transgenele* provin de la organisme incompatibile sexual, pot avea orice origine (inclusiv gene artificiale), iar secvențele genice au orientare antisens (Schouten et al., 2006), [90]. Prin urmare, cisgeneza nu depășește barierele reproductive dintre specii, organismele cisgenice fiind asemănătoare celor obținute prin ameliorarea convențională, ele neavând alterat fondul de gene și în consecință nu prezintă nici un fel de risc pentru om sau mediu. Cisgeneza pare a fi o metodă utilă de ameliorare a plantelor ce se propagă vegetativ. Un exemplu îl reprezintă introducerea de la forme sălbatice la cele cultivate de măr a genei (Vf) de rezistență la rapăn sau, în cazul cartofului, a genelor de rezistență la *Phytophthora infestans* de la specii sălbatice de *Solanum* (*S. demissum* și *S. bulbocastanum*), (Schouten et al., 2006), [90].

Dacă, prin manipulare genetică, un organism a încorporat o genă străină lui, el se numește *organism transgenic*, iar dacă încorporează mai multe gene străine se numește organism *multiplu transgenic* (Bagle et al., 2013), [5]. În Uniunea Europeană un organism modificat genetic este definit ca fiind ”*un organism, exceptând omul, în care materialul genetic a fost schimbat într-un mod care nu se produce natural – prin împerechere și/sau recombinare naturală*”. Potrivit Protocolului de Biosiguranță de la Cartagena, care reglementează comerțul internațional cu aceste organisme, un OMG reprezintă ”*orice organism viu care posedă o nouă combinație a materialului genetic, obținută prin folosirea biotehnologiilor moderne*”.

Pentru acțiunile de transgeneză la procariote și eucariote este necesară izolarea genei de interes și a unui vehicul (vector) pentru clonarea și transferul ei într-o celulă/organism receptor. Cea mai folosită metodă de a izola și transfera genele este *tehnologia ADN-recombinant* (adiția de material genetic de la un organism diferit), (fig. 1). Primele molecule de ADN recombinant (ADNr) au fost obținute de biochimistul Paul Berg în 1972 (un hibrid ADN între fagul lambda și genomul virusului SV40), realizare onorată cu premiul Nobel în Chimie în 1980 (premiu împărțit de Paul Berg cu Walter Gilbert și Frederick Sanger). Acest ADN hibrid urma să fie plasat în bacterii de *Escherichia coli*, dar Berg și colaboratorii nu au făcut acest pas temându-se de eventualele consecințe

greu de anticipat în acel moment (SV40 provocând cancer la șoareci, iar *E. coli* fiind o bacterie comună în microbiota intestinală la om) [141]. În ce constă această tehnologie? Ea presupune secționarea și apoi unirea unor segmente de ADN de la două organisme diferite. În cazul transgenezei, un segment de ADN din genomul unui organism este inserat în genomul altui organism, acțiune ce determină schimbarea genotipului și implicit a fenotipului organismului receptor. Tehnicile ingineriei genetice permit:

- studiul structurii, expresiei și reglării genelor;
- schimbarea genelor pentru obținerea unor produși modificați de expresie a lor;
- stimularea sau inhibarea expresiei genelor pentru un anumit produs;
- multiplicarea artificială a unui segment de ADN;
- transferul de gene de la un organism la altul;
- obținerea de organisme cu caractere schimbate sau dorite [84, 138].

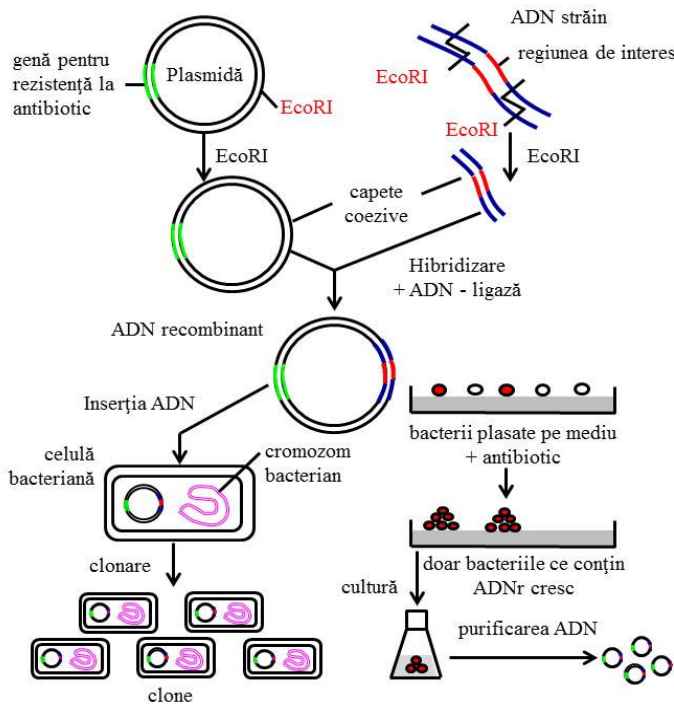


Fig. 1 - Schemă privind inserția în plasmide a unei gene străine și clonarea ei în bacterii (www.biosiwa.50webs.org/dnacloning.htm), [134]

Genele (transgenele) pot fi sintetizate artificial sau, plecând de la ARN mesager specific unei anumite proteine (extras din țesutul unde aceasta este bine reprezentată), cu ajutorul transcriptazei inverse (revers-transcriptazele au fost descoperite în 1970 de H. Temin și S. Mizutani) se sintetizează un ADN monocatenar complementar (un ADNc), care este adus în stare dublucatenară prin folosirea ADN-polimerazei. Gena astfel izolată sau sintetizată chimic (numită și *pasager*) este apoi inserată, cu ajutorul *enzimelor de restricție* și *ADN-ligazei*, într-un *vector* (vehicul) de clonare și transfer (plasmide, virusuri etc), care o va transporta în celula/organismul gazdă.

În cazul procariotelor acești vectori sunt plasmidele și virusurile (capabile să se replice autonom față de genomul bacterian), în timp ce la eucariote este necesară integrarea genelor străine în cromosomii celulei gazdă pentru ca acestea să se exprime (celulele eucariote având mai rar episomi în interiorul lor). Totuși, așa cum vom constata pe parcursul lucrării de față, și la plante se folosesc unele plasmide ca vectori de transgeneză, după cum unele virusuri pot fi vectori de transfer ai genelor în celulele animale.

De ce inginerie genetică și organisme transgenice? Pentru că aceste tehnici au numeroase utilizări și promet rezolvarea unor probleme cărora omul nu le-a găsit încă soluții. Principalele obiective care pot fi atinse cu ajutorul transgenezei sunt:

- schimbarea ținută a unor caractere de producție și calitate ale organismelor (microbi, plante, animale) și creșterea productivității lor într-o serie de produși necesari omului;
- inducerea rezistenței unor organisme (plante de cultură, animale de fermă) la factori biotici și abiotici;
- obținerea de proteine terapeutice recombinant de interes medical și testarea eficacității lor;
- studiul unor boli specifice umane prin transferul de gene umane la organisme animale;
- dezvoltarea de organisme (microorganisme și plante) capabile să viețuiască în condiții extreme (pe terenuri aride, saline, poluate cu metale grele etc);
- obținerea de animale transgenice test (senzor) pentru decelarea unor poluanți acvatici;
- studii de genetică a dezvoltării la mamifere și studiul expresiei unor gene;
- dezvoltarea unor animale utile în acțiuni de xenotransplantare la om;
- terapia genică la om etc.

Practicarea tehnologiei ADN-recombinant ridică însă și o serie de probleme, cum ar fi:

- probleme de siguranță la om (pot fi obținute, de exemplu, microorganisme rezistente la antibiotice);
- organismele transgenice pot ridica unele probleme de mediu;
- există posibilitatea de abuz experimental în medicină (ca unii medici să folosească pacienții ca subiecți pentru testarea unor proteine terapeutice recombinant);
- nu este exclus ca pe lângă tratarea unor boli la liniile germinale umane să se ajungă la selecția unor caractere dorite de părinți la copiii lor;
- folosirea acestor tehnici ridică și unele probleme de ordin etic [152].

Primele transformări genetice s-au produs în 1978 la drojdii, apoi în 1979 au fost transformate celule de șoarece, în 1980 au fost transformați embrioni de șoarece (care ulterior au dus la obținerea de "superșoareci" – prin transferul în genomul lor a genei hormonului de creștere uman), iar în 2001 s-a obținut prima maimuță transgenică (din genul *Rhesus*). La plante, transformarea genetică este mai dificilă din cauza pereților celulari. În 1983 s-au folosit prima dată plasmidele Ti ca vectori pentru transferul de ADN străin în celulele plantelor [126].

În ultimii cca 25 de ani s-a acumulat un volum imens de informații în domeniul transgenezei la organismele vii. Nu este în intenția noastră ca, în cele ce urmează, să intrăm în detaliile acestui subiect (extrem de dinamic și fecund), ci dorim să familiarizăm cititorii avizi de cunoaștere, indiferent de pregătirea lor, cu unele din tehnicile ingineriei genetice, cu potențialul și impactul acestei tehnologii asupra mediului, a vieții în general și a omului. Lucrarea se vrea o sinteză succintă a progreselor și realizărilor înregistrate în domeniul transferului de gene la organismele vii (în special, la animale și plante), a avantajelor și dezavantajelor acestei tehnologii, dar și a unor dispute și controverse stârnite de folosirea ei.

1. Enzimele de restricție și modificare

Fenomenul de restricție și modificare (R-M) a fost observat încă la începutul anilor 1950 (Luria și Human, 1952; Bertani și Weigle, 1953 - citați de Roberts, 2005), [86], când s-a constatat că unii bacteriofagi se deosebeau în privința capacității lor de a crește pe diverse tulpini bacteriene gazdă, fenomen interpretat ca fiind un tip de variație indusă sau controlată de gazdă. Cu alte cuvinte, tulpinile bacteriene dotate cu sistem R-M erau mai puțin susceptibile la infecțiile cu bacteriofagi decât alte tulpini. Două decenii mai târziu, Smith și Wilcox (1970) [96], Kelly și Smith (1970) [47] descopereau și descriau endonucleaza R, izolată din bacteria *Haemophilus influenzae*, enzimă capabilă să fragmenteze specific ADN-ul fagului T7. Unele tulpini bacteriene pot conține până la 6 sisteme diferite R-M. Au fost izolate și clonate peste 160 de sisteme R-M. Genele specifice acestor enzime (de restricție și de modificare) sunt localizate fie pe cromosomul bacterian, fie pe plasmide și, de regulă, sunt dispuse în proximitate [137].

Enzimele/endonucleazele de restricție acționează ca un fel de "bisturie moleculară", ce secționează moleculele de ADN în locuri specifice (recunosc anumite secvențe de nucleotide din ADN), producând câte o incizie pe fiecare dintre cele două catene ale dublului helix de ADN. Secvențele de restricție pe cele două catene pot fi dispuse în aceeași direcție sau în direcție opusă (palindrom). Unele enzime de restricție secționează cele două catene ADN în mod simetric, altele – asimetric. În tehnologia ADN-recombinant sunt utile doar enzimele ce secționează asimetric ADN-ul [138]. Aceste enzime sunt specifice bacteriilor și archaea și reprezintă un soi de imunitate primitivă, prin care aceste microorganisme se apără împotriva virusurilor invadatoare. Fragmentele de ADN produse de enzimele de restricție devin susceptibile degradării lor de către exonucleaze.

Enzima de modificare din sistemul R-M este o metiltransferază, care recunoaște aceeași secvență de ADN ca și endonucleaza specifică acelei secvențe, și catalizează transferul unei grupări metil de la cofactorul S-adenozil-L-metionină (AdoMet) la unele baze din secvența dată. Acestei modificări, prin metilare, pot fi supuse ambele catene ale ADN sau numai una dintre ele. Este o modalitate prin care este împiedicat accesul endonucleazelor la molecula ADN și implicit clivajul acesteia. Metiltransferazele sunt de două categorii: a) unele metilează carbonul-5 de la citozină formând 5-metilcitozina (5mC); b) altele metilează fie gruparea amino exociclică a citozinei formând N-4-metilcitozina (N4mC), fie a adeninei formând N-6-metiladenina (N6mA) [137].

Nomenclatura enzimelor de restricție a fost propusă de Smith și Nathans (1973) [97], care au sugerat în acest sens un acronim format din trei litere, din care prima reprezintă genul, iar următoarele două specia bacteriană la care s-a identificat enzima. Acest acronim poate fi urmat de o literă și de cifre, care semnifică tulpina bacteriană din care s-a izolat enzima de restricție, și respectiv numărul enzimei identificate la specia în cauză. De exemplu, EcoRI reprezintă enzima de restricție izolată din *Escherichia coli*, tulpina R, enzima I, dar și Eco RII și EcoRV – ca sisteme diferite derivate din tulpina R de *E. coli* [137]. Într-o lucrare de sinteză din 2003, Roberts et al. [85] consideră că trebuie evitat termenul de *restrictaze* pentru enzimele de restricție și cel de *metilaze* pentru metil-transferaze. Aceiași autorii arată că abrevierile frecvent folosite pentru aceste enzime sunt: *REase* - pentru enzimele de restricție, *MTase* - pentru metiltransferaze. În funcție de compoziția lor, cofactorul necesar, natura secvenței țintă, poziția sitului de clivare etc, sistemele R-M sunt grupate în trei categorii (tipuri) principale: Tipul I, II și III (la acestea fiind adăugat Tipul IV, format din enzime ce secționează ADN metilat), [58, 85, 132,137, 140, 147, 153].

Sistemele R-M de Tipul I sunt proteine multifuncționale, care au funcția de restricție și modificare în aceeași proteină (în diversele ei subunități). Ele sunt constituite din 3 subunități: HsdR (pentru activitatea de restricție), HsdM (pentru activitatea metil-transferazică) și HsdS (pentru legarea la secvența de ADN recunoscută). Subunitatea R face parte din superfamilia de proteine SNF2 helicază/translocază. Subunitatea S conține două regiuni variabile de cca 150 aa, care alternează cu regiuni mai mici conservate. Fiecare regiune variabilă recunoaște o parte a secvenței țintă bipartite (Loenen et al., 2013), [58]. REazele din Tipul I au nevoie de cofactori pentru funcționare: AdoMet, ATP și ioni de Mg^{++} [137, 140]. În funcție de starea de metilare a ADN țintă, ele acționează ca enzime de restricție sau de modificare. Enzimele de Tipul I clivează ADN la distanțe variabile, departe de secvența de recunoaștere (Roberts et al., 2003) [85]. Sunt enzime cu flexibilitate enormă, care le permite schimbări conformaționale importante (Loenen et al., 2013) [58].

Sistemele R-M de Tipul II sunt mult mai numeroase decât cele de Tipul I și au peste 230 de specificități diferite [137]. REazele recunosc secvențe specifice (fixe) ale ADN (palindroame de 4-8 nucleotide), produc fragmente distincte de ADN, au nevoie doar de Mg^{++} ca și cofactor și clivează ADN în interiorul, sau în apropierea secvenței de recunoaștere. Acționează ca monomeri, dimeri și chiar tetrameri și, de regulă, independent de MTaza specifică (activă în

stare de monomer). S-au descoperit și caracterizat peste 3500 de REaze de Tipul II, fiind cele mai folosite endonucleaze în tehnologia ADN-recombinant. Între timp (după 1990), s-au identificat o serie de enzime din această familie (grup), care diferă de tipul standard în privința structurii lor sau a proprietăților de clivaj, fapt ce a dus la împărțirea Tipului II de REaze în subgrupuri (subtipuri), notate cu litere mari: A, B, C, E, F, G, H, M, P, S, T.

Enzimele din subtipul IIA recunosc secvențe asimetrice; cele din subtipul IIB sunt multimerice și reclamă două situri de recunoaștere; enzimele din subtipul IIC au ținte simetrice sau asimetrice, iar domeniile R și M fuzionează în același polipeptid; subtipul IIE reclamă două situri de recunoaștere, iar unul dintre ele acționează ca efector alosteric; enzimele din subtipul IIP recunosc secvențe simetrice palindromice; subtipul IIG au ținte simetrice sau asimetrice și necesită AdoMet; enzimele din subtipul IIM reclamă ținte metilate; cele din subtipul IIT au ținte simetrice sau asimetrice, iar genele R sunt heterodimere etc, [58, 85, 140, 153].

Sistemele R-M de Tipul III sunt mai puțin răspândite (se cunosc doar câteva) și au patru specificități diferite [137]. REazele acestui sistem necesită ATP și AdoMet, recunosc două secvențe separate de 5-6 pb, ne-palindromice, orientate invers, secționează ADN la cca 20-30 (25-27) pb în aval de locul de recunoaștere, sunt alcătuite din 2 subunități - Mod și Res (codificate de genele *mod* și respectiv *res*), prima fiind responsabilă de activitatea de recunoaștere și modificare, iar cea de a doua pentru activitatea de restricție. Subunitatea Mod poate acționa independent de subunitatea Res [140, 153].

Tipul IV de REaze sunt enzime care se bucură de un interes deosebit în ultimii ani (prin descoperirea hm5C în ADN-ul eucariotelor superioare), sunt codificate de una sau două gene și clivează numai ADN modificat (ce conține baze metilate, hidroximetilate sau glucozil-hidroximetilate). Secvențele lor de recunoaștere nu sunt încă bine definite, dar aceste enzime au capacitatea de a distinge variații moleculare ale citozinei în ADN (de tipul C, m5C și hm5C), ceea ce le poate face utile în studii de epigenetică (Loenen et al., 2013) [58].

Descoperirea enzimelor de restricție a permis dezvoltarea de tehnici pentru cartografierea și amprentarea ADN {prin care se monitorizează polimorfismele de lungime a fragmentelor de restricție (RFLP), acțiune ce permite localizarea mutațiilor, obținerea hărților de linkage la om, depistarea genelor bolnave, dar și soluționarea cazurilor de paternitate în medicina legală}, secvențierea ADN, identificarea unor tulpini bacteriene patogene pentru om și

animale, dar și dezvoltarea tehnologiei ADN recombinant (care a asigurat transferul de gene între cele mai diverse organisme), [58, 86].

În acțiunile de transgeneză, cum prezentam anterior, cel mai mare impact l-au avut enzimele de restricție de Tipul II. Unele enzime de acest tip (cele mai multe) secționează ADN-ul în mod defazat, asimetric (exemple - enzima Eco RI, XmaI), rezultând extremități monocatenare *coezive* de ADN (*sticky ends*), altele (mai rar) secționează simultan (simetric) ambele catene de ADN (exemple - HinII, SmaI), rezultând capete *boante* (*blunt ends*) [138,147]. Secvențele de recunoaștere sunt formate dintr-o suită de 4-8 perechi de baze. Lungimea acestor secvențe diferă de la o enzimă de restricție la alta. Așa de exemplu, în cazul enzimei Sau3AI secvența este formată din 4 perechi de baze, în cazul enzimelor EcoRI, SacI și SstI - din 6 perechi de baze, iar a enzimei NotI – din 8 perechi de baze. Lungimea acestei secvențe dictează frecvența cu care enzima de restricție va secționa molecula ADN. Enzimele la care secvența de recunoaștere este formată din 4pb vor secționa la fiecare cca 4⁴ pb (256pb), cele care au 6pb vor secționa la cca 4⁶pb (4096 pb) etc [153].

Secvențele de recunoaștere sunt dispuse în multe cazuri sub formă de *palindroame*, care pot fi de tip *oglinďă* (exemplu: GTAATG) sau *repetate invers* (exemplu: GTATAC pe o catenă și CATATG pe cealaltă catenă a ADN). Se apreciază că peste 600 de astfel de enzime sunt disponibile comercial și folosite în cercetările de biologie moleculară din laboratoarele cu acest profil, [148]. În figura 1 se poate observa cum este folosită enzima EcoRI la izolarea unei gene de interes, dar și pentru secționarea ADN plasmidial și inserția (cu ajutorul ADN-ligazei) a genei străine în plasmidă.

Enzimele de restricție au locuri (situri) de recunoaștere pe molecula de ADN. Unele enzime au același sit de recunoaștere, caz în care se numesc *izoschizomere* (de exemplu, enzimele SacI și SstI), [153].

Locurile de recunoaștere pot fi:

- a) *ne-ambiguous*, situație în care enzima recunoaște întotdeauna aceeași secvență (pentru BamHI, de exemplu, secvența GGATCC) și nu alte secvențe;
- b) *ambiguous*, care recunosc mai multe secvențe, dar care încep și se termină cu anumite baze (de exemplu HinFI recunoaște o secvență de 5 baze, care începe cu GA și se termină cu TC, a cincea bază fiind oricare din cele patru).

Totodată, locul de recunoaștere pentru o enzimă poate conține locul de restricție pentru o altă enzimă. Enzimele de restricție hidrolizează legătura dintre dezoxiriboză și grupările fosfat din ADN. Hărțile de restricție arată locurile de restricție cunoscute dintr-o secvență de ADN, [153].

În tabelul 1 prezentăm câteva exemple de enzime de restricție, proveniența lor (bacteria), secvențele de ADN recunoscute și locul de secționare a ADN.

Tabel nr. 1 – Unele enzime de restricție și caracteristicile lor

Enzima de restricție	Bacteria	Tulpina/enzima	Secvența recunoscută/ Locul secționării
Eco RI	<i>Escherichia coli</i>	RY13, enzima 1	G↓AATTC
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	H, enzima 1	G↓GATCC
Bgl II	<i>Bacillus globigii</i>	enzima 2	A↓GATCT
Sal I	<i>Streptomyces albus</i>	enzima 1	G↓TCGAC
Pst I	<i>Providencia stuartii</i>	164, enzima 1	CTGCA↓G
Hind II	<i>Haemophilus influenzae</i>	D, enzima 2	A↓AGCTT
Kpn I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	enzima 1	GGTAC↓C
Xba I	<i>Xanthomonas brasiliensis</i>	enzima 1	T↓CTAGA
Sau 3AI	<i>Staphylococcus aureus</i>	3A, enzima 1	N↓GATCN (N = oricare bază)
Hae III	<i>Haemophilus aegypticus</i>	enzima 3	GG↓CC

(www.docstoc.com/docs/20373369/introduction-to-cloning-and-recombinant-DNA-technology[134]; ro.scribd.com/doc/979797996/Adn-Recombinant-Doc)[147].

Restrictaza EcoRI (de la *Escherichia coli*) spre exemplu, recunoaște secvența de nucleotide 5'-G↓AATTC-3' pe o catenă a ADN, respectiv secvența 3'-CTTAA↓G-5' pe cealaltă catenă a ADN și secționează defazat cele două catene, generând *capete coezive*, în timp ce restrictaza SmaI (de la *Serratia marcescens*) recunoaște secvența de nucleotide 5'-CCC↓GGG-3' pe una din catenele ADN, respectiv 3'-GGG↓CCC-5' pe cealaltă catenă și secționează simultan, în același loc, ambele catene de ADN, generând *capete boante* (după modelul de mai jos), [132, 138, 147].

G ↓ A A T T C	CCC ↓ GGG
C T T A A ↑ G	GGG ↑ CCC
EcoRI, capete coezive	SmaI, capete boante

Capetele coezive ale segmentului de ADN clivat vor adera la cele ale vectorului, unindu-se prin intervenția ADN-ligazei. Enzima poate reuni atât capetele coezive de ADN cât și capetele boante ce rezultă din acțiunea enzimelor de restricție, dar este mai eficientă în legarea capetelor coezive (Rao, 2006) [84].

Cum s-a arătat anterior, enzimele de modificare din sistemul R-M "recunosc" și "modifică" (prin reacții de metilare) aceeași secvență de nucleotide din ADN ca și enzimele de restricție corespunzătoare. Modificarea protejează ADN-ul bacteriilor de a fi degradat, iar enzimele de restricție împiedică încorporarea de ADN străin în genomul acestora, ADN care, dacă nu este modificat corespunzător, este supus hidrolizei de către exonucleaze până la monomerii constitutivi.

2. Vectori folosiți în transferul genelor

Vectorul este un intermediar între gena ce urmează a fi clonată (și transferată) și celula receptoare. Vectorii de transfer ai genelor pot fi plasmidele, bacteriofagii, cosmidele, cromosomii bacterieni artificiali, cromosomii artificiali de drojdii [132].

Pentru a fi util în acțiunea de transfer al genelor la bacterii, un vector trebuie să întrunească o serie de condiții:

- să fie de dimensiuni mici și să nu posedă informație genetică esențială;
- să se replice autonom și să fie tolerat de celula gazdă;
- să prezinte în structura lui doar un situs de recunoaștere pentru enzima de restricție folosită (pentru ca transgena încorporată în el să nu-i perturbe funcțiile);
- să fie ușor de izolat și sensibil la aceleași endonucleaze de restricție ca și gena străină ce va fi integrată în el;
- să determine manifestarea de către celula gazdă a unor însușiri ușor de evidențiat (cum ar fi rezistență la antibiotice, auxotrofie, plaje de liză specifice etc), care să faciliteze identificarea celulelor transformate genetic etc, [32, 33].

Vectorii menționați anterior pot transfera fragmente de ADN (gene) de dimensiuni diferite. Astfel, plasmidele au capacitatea de a transfera gene de până la cca 5kb, cromosomul fagului lambda de până la 15-16 kb, cosmidele (vectori ce combină însușiri de la plasmide și fagi) pot găzdui segmente de ADN de până la 50 kb, cromosomul artificial de bacterii - segmente de până la 300kb, iar cromosomul artificial de drojdii (YAC; YAC3 este în fapt o plasmidă pBR322 la care s-au inserat gene de drojdii) poate încorpora și transfera în mod obișnuit fragmente de ADN de cca 600kb, iar anumite tipuri pot transfera segmente ADN care pot atinge până la 1400kb, [84,132, 138]. Transferul genelor în celulele eucariotelor poate fi realizat prin metode *chimice* (cu ajutorul fosfatului de calciu, liposomilor, DEAE-dextran, PEG, a unor secvențe peptidice etc), *fizice* (prin electroporație, biolistică) și *biologice* (prin intermediul virusurilor, al unor plasmide), [48]. Transgena trebuie să aibă o expresie controlată, astfel că un construct de acest gen este format din promotor, gena propriu-zisă, o genă marker selectabilă și un terminator. Cu ajutorul genei marker se pot distinge celulele transformate genetic de cele netransformate [139].

În legătură cu procesul de transfer al genelor de la un organism la altul întâlnim în literatura de profil termenii de: *transformare*, *transfecție* și

transducție genetică. Prin transformare genetică se înțelege transferul de ADN în celulele bacteriilor, plantelor și altor celule eucariote (exceptând celula animală), cu ajutorul unor metode chimice, fizice, a plasmidelor etc. Prin transfecție se înțelege transferul de ADN exogen (ne-mediat de virusuri) în celulele animale, prin metode chimice și fizice (într-un articol publicat în 2005, Ma și Chen descriu nu mai puțin de 9 astfel de metode), [59]. Prin transducție se înțelege transferul de material genetic între bacterii, prin intermediul virusurilor.

La *microorganisme*, vectorii cei mai folosiți în transferul genelor străine sunt plasmidele, formațiuni celulare bacteriene (molecule circulare de ADN) capabile să se replice independent de cromosomul bacterian. Inserția unei gene străine într-o plasmidă vector se numește clonare, iar plasmida ce conține transgena se numește plasmidă chimeră [138]. Transgena este în fapt un ADNc (un ADN lipsit de introni, pe care bacteriile gazdă nu au posibilitatea să-i elimine) [132]. Plasmidele folosite ca vectori de clonare trebuie să conțină: - o origine a replicării; - o genă marker selectabilă (pentru rezistență la antibiotice, de exemplu); - locuri multiple de clonare (care să permită inserția de ADN străin fără să-i perturbe replicarea sau să inactiveze markerii); - să fie ușor de purificat de ADN-ul gazdă [134].

Prima plasmidă vector, *pSC-101* (care prezenta o genă marker pentru rezistență la tetraciclină), a fost izolată de Cohen (în 1973) din factorul de rezistență la bacilul colic. Cele mai utilizate plasmide în transgeneză la microorganisme sunt *pBR-322* - care conține gene marker de rezistență la tetraciclină (*tet^R*) și ampicilină (*amp^R*), (numele ei derivă astfel: p - de la plasmidă; BR - de la Bolivar și Rodriguez, cercetătorii care au dezvoltat această plasmidă, iar 322 - numărul care o distinge de alte plasmide realizate în laboratorul celor doi cercetători) și *pUC18* (care conține o parte a genei reporter pentru β-galactozidază, ce conferă coloniilor provenite din celulele transformate genetic culoare albastră) etc [132].

La *plante* sunt frecvent folosite ca vectori plasmidele *Ti* de la *Agrobacterium tumefaciens* (ce provoacă tumorile crown-gall în zona coletului unor dicotiledonate) și *Ri* de la *Agrobacterium rhizogenes* (care produc fenomenul de *hairy roots*). În 1983 s-a reușit modificarea plasmidelor la plante, în așa fel încât să li se înlăture capacitatea de a induce tumori plantelor și a fi astfel folosite doar pentru a încorpora ADN străin [127]. În transferul genelor la plante sunt folosite și alte metode, ca: *microinjectarea*, *electroporația*, *endocitoza*, *bombardarea cu microparticule* încărcate cu ADN (*biolistica*), *PEG*, *lipozomii* etc. Unele din aceste metode sunt practicate și la animale. Dintre

tehnicele menționate, cele mai multe OMG la plante s-au obținut folosind plasmidele Ti și biolistica.

La *animale*, o metodă simplă și frecvent utilizată de transgeneză este micro-injecția în celula ou (imediat după fecundare) a unei soluții în care se găsesc copii numeroase ale transgenei. Materialul genetic străin este injectat în pronuclei, iar dacă se injectează în citoplasmă el trebuie asociat cu *poli-lizina*, care îl ferește de degradare enzimatică. Gena străină poate fi injectată și în celulele stem embrionare aflate în stadiul de blastocist (care pot fi cultivate în laborator și pot să se dezvolte în indivizi întregi). Oul sau blastocistul transformat genetic sunt implantate într-o mamă pentru gestație. Ca vectori ai transgenelor la animale se mai folosesc și vectori virali: unele retrovirusuri, mutanți ai *fagului lambda* (denumiți fagi Charon), mutanți ai *virusului simian SV40*, ai *virusului papilloma bovin* (BPV), *lentivirusuri*, vectori rezultați din combinarea între fagi și plasmide (*cosmide*) etc.

Cele mai eficiente tehnici utilizate în transgeneză la animale sunt: microinjecția ADN în pronucleul celulei ou imediat după fecundare (Gordon și Ruddle, 1981) [34], transferul mediat de celulele stem embrionare (Gossler et al., 1986; Gama Sosa et al., 2010) [35, 26] și transferul mediat de retrovirusuri (Jaenisch, 1976) [43]. În cazul transgenezei mediate de celulele stem embrionare, se izolează mai întâi celule stem totipotente din embrion, apoi se înserează transgena dorită în aceste celule, rezultând un animal chimeră, (Endang, 2003) [23]. Pentru transformarea genetică a celulelor de mamifere și obținerea de linii celulare producătoare de proteine recombinant terapeutice se folosesc ca metode: a) co-precipitarea ADN-fosfat de calciu, prin care ADN este încorporat într-un precipitat fin de fosfat de calciu și transferat celulelor (prin transfecție); b) lipofecția – în care ADN este adsorbit la mici vezicule lipidice sferice care fuzionează cu membrana celulelor de mamifere; c) electroporația este o metodă de a transforma celulele în suspensie de mamifere (Mahmoud, 2007), [63]. Animalele pot fi folosite în producerea de proteine recombinant fie în sistemul culturilor *in vitro* de celule animale modificate genetic, fie prin acumularea lor în anumite țesuturi, organe, fluide în cazul animalelor transgenice (în lapte, de exemplu, la mamifere).

Într-o lucrare de sinteză, Khan (2010) [48] face aprecieri comparative privind aplicațiile, avantajele și limitele unora din metodele de transgeneză prezentate mai sus. Astfel, electroporația are avantajul că este o metodă rapidă, puțin costisitoare, poate fi aplicată pe diverse tipuri de celule, pot fi tratate simultan multe celule, pot fi produși transformanți stabili într-un procent ridicat.

Tehnica este folosită pentru introducerea de ADN străin în linii celulare animale, în protoplaști ai plantelor, drojdiilor și bacteriilor, pentru creșterea eficienței transformării sau transfecției bacteriilor. Metoda a asigurat transformarea stabilă la grâu, orez, porumb și tutun cu o frecvență de până la 1%. Electroporarea embrionilor timpurii poate asigura producerea de animale transgenice; pot fi transformate prin această tehnică hepatocite, celule epidermice, celule stem hematopoietice, fibroblaste, limfocite T și B de șoarece etc [48].

În cazul microinjectării avantajele sunt: frecvența de integrare stabilă a ADN exogen este cea mai ridicată comparativ cu alte metode; este o metodă eficientă atât în transformarea celulelor primare cât și a culturilor stabile; ADN-ul injectat este supus la cele mai puține modificări etc. Metoda microinjectării este folosită în special în transgeneza celulelor animale, este utilă în transferul genelor în celulele embrionare, asigură obținerea rapidă de animale transgenice, s-a dovedit utilă și în transformarea celulelor și protoplaștilor de tutun și lucernă etc. Limitele metodei: este utilă mai ales la celulele animale, este costisitoare, necesită personal calificat, solicită sincronizarea împerecherii și recuperarea ovocitului, integrarea genei este întâmplătoare etc (Khan, 2010) [48].

Avantajele biolisticii sunt: evită necesitatea de a avea protoplaști, pot fi penetrate celule intacte (cu pereți celulari), se poate realiza manipularea genomului organitelor. Limitele metodei sunt: integrarea ADN străin este întâmplătoare și practicarea ei necesită echipamente speciale. Această tehnică a fost folosită cu succes: în acțiuni de transgeneză la soia, bumbac, molid, sfecla de zahăr, papaia, porumb, floarea soarelui, grâu, tutun etc; poate fi aplicată și la fungii filamentozși și drojzii (mitocondrii); pot fi manipulate și organite celulare (au fost transformate mitocondrii la plante și cloroplaste la *Chlamidomonas*); pot fi supuse bombardării cu particule încărcate cu ADN și polenul, embriozii în stadiul timpuriu, meristemele și embrionii somatici (Khan, 2010) [48].

Indiferent de tehnica utilizată în transgeneză la mamifere, rata de succes în obținerea de animale nou născute care poartă transgena, este foarte scăzută. Folosind metoda microinjectării ADN, de exemplu, Hammer et al. (1985) [40] arătau că această rată a fost: la iepuri de 1,5% (28 urmași din 1907 ovule fecundate injectate), la porci de 1%, la oi de doar 0,1% (1 urmaș transgenic din 1032 ovule injectate).

Când se folosesc retrovirusurile ca vectori de transgeneză la animale rezultă în prima fază o chimeră, iar chimerele se încrucișează apoi între ele timp de peste 20 de generații, până se atinge starea homozigotă a genei în toate

celulele organismului, care să asigure astfel obținerea de urmași transgenici (Endang, 2003) [23].

Deși nu ne-am propus să abordăm problema folosirii ingineriei genetice în terapia genică și tratarea cancerului la om, vom spune totuși că în încercările de acest gen *ex vivo* și *in vivo* se folosesc sisteme vector virale derivate din retrovirusuri, adenovirus, virusul adeno-asociat, poxvirus, virusul herpetic etc, și se fac eforturi în direcția îmbunătățirii infectivității lor, a țintelor virale, a exprimării specifice a transgenelor funcție de tipul celular, a duratei de expresie a acestora (Walther și Stein, 2000) [112]. Dintre vectorii menționați, par a fi de perspectivă în transferul de ADN exogen la om și animale - retrovirusurile, întrucât au o eficiență ridicată în transferul de gene, se integrează stabil în genomul gazdă și asigură expresia pe termen lung a genei inserate. Au însă și dezavantaje: infectează eficient celulele somatice și mai puțin celulele germinative, integrarea lor este întâmplătoare în genomul gazdă (ceea ce poate antrena efecte dăunătoare), infectează doar celule în diviziune (Khan, 2010) [48]. În general, studiile de transgeneză și mutațiile induse la om se întreprind pe modele animale (Simmons, 2008) [95].

3. Unele realizări în domeniul transgenezei

Pe lângă multiplele realizări și așteptări deschise de tehnologia ADN recombinant (ADNr) în domeniul aplicativ, ea a contribuit și va asigura și pe viitor progrese importante ale cunoașterii în domeniul biologiei celulare și moleculare a organismelor vii.

Cu ajutorul acestei tehnologii și al tehnicilor ingineriei genetice, se pot transfera gene de interes medical la microorganisme și în acest mod să se producă o serie de proteine umane necesare în terapie, se pot obține plante și animale transgenice cu caractere noi, ele însele producătoare ale unor substanțe utile omului (proteine, antibiotice, anticorpi monoclonali etc). Aceste tehnici au devenit totodată instrumente utile în medicina legală, iar într-o bună zi (care pare tot mai aproape) vor permite intervenția în corectarea unor boli și anomalii genetice la om (terapia genică) și evitarea traumelor fizice și psihice prin care trec mulți dintre semenii noștri din cauza acestora.

În opinia lui Panda (2008), cele mai importante realizări ale tehnologiei ADNr ar fi următoarele:

- producția pe scară largă de proteine terapeutice (hormoni, vaccinuri, interleukine etc) cu ajutorul microorganismelor manipulate genetic;
- realizarea de anticorpi monoclonali pentru aplicații terapeutice la om;

- producerea de plante (Bt) rezistente la insecte (prin transferul genei cu efect insecticid de la *Bacillus thuringiensis*);
- obținerea orezului de aur, bogat în vitamina A, prin transferul în genomul lui a 3 gene implicate în sinteza acestei vitamine;
- folosirea organismelor manipulate genetic în bioremediere;
- utilizarea tehnicilor de inginerie genetică în medicina legală [76].

În figura 2 sunt schițate unele din aplicațiile tehnologiei ADN recombinant, din care ne putem face o impresie despre impactul ei deosebit sub aspect teoretic și mai ales aplicativ [132].

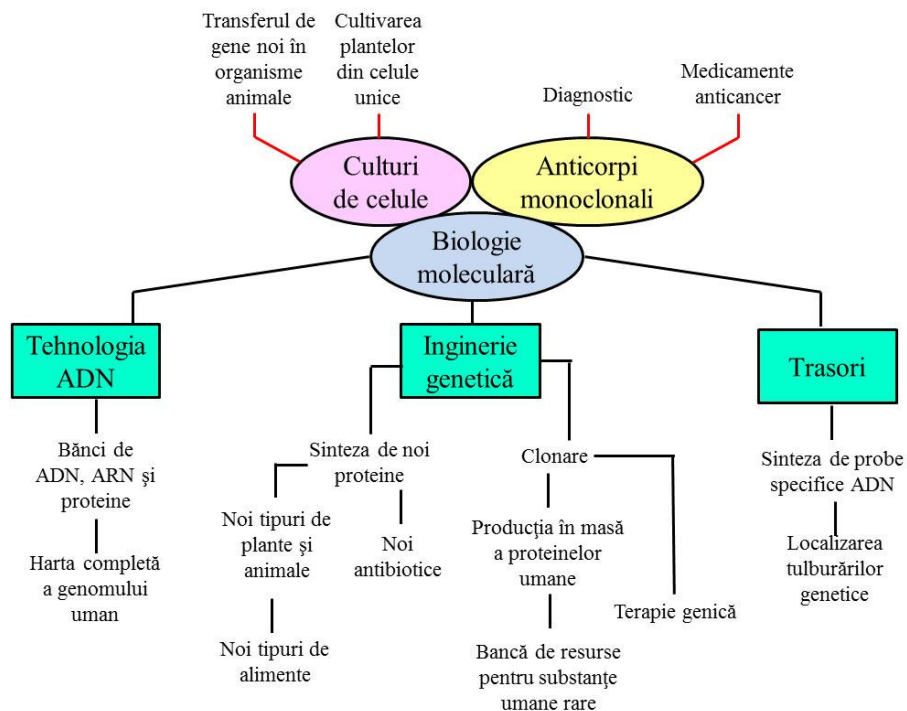


Fig. 2 – Aplicații ale tehnologiei ADN-recombinant (ADNr)
(www.biosiwa.50webs.org/dnacloning.htm) [132]

Metodele tradiționale (clasice) de îmbunătățire a însușirilor de producție și de calitate la plantele de cultură și animalele de fermă se bazează în special pe specularea fenomenului de recombinare genetică, datorat reproducerii sexuate. În acest caz sunt selectate formele superioare care apar în descendența unor încrucișări între indivizii cu însușiri dorite de ameliorator. Prin transgeneză, se

transferă direct una sau câteva gene de interes de la un organism donator în genomul unui organism receptor. Dacă în ameliorarea clasică formele dorite nu pot fi obținute decât la organisme compatibilele sexual, în ameliorarea prin transgeneză sunt învinse barierele reproductive dintre specii, fiind posibil – cum am specificat deja, transferul de gene/caractere între organisme care aparțin nu numai la specii diferite, ci chiar la regnuri diferite.

Cercetările în domeniul transgenezei au confirmat încă o dată, dacă mai era nevoie, universalitatea codului genetic. Ameliorarea prin transgeneză, față de cea prin metode clasice, este totodată: a) *mai specifică* (cercetătorul poate alege exact caracterul pe care vrea să-l promoveze, eliminând caracterele adiționale nedorite); b) *mai rapidă* (caracterul urmărit poate fi promovat într-o singură generație); c) *mai felexibilă* (pot fi achiziționate/dobândite caractere absolut noi, nespecifice organismului manipulat genetic); d) *mai puțin costisitoare* (presupune un volum de lucru mai redus și costuri mai mici), [131].

Gama tipurilor de biomolecule produse prin tehnologia ADN_r este diversă (Panda, 2008) [76]:

- *hormoni* - insulină și analogii ei, hormoni de creștere, hormonul de stimulare foliculară, calcitonina de somon;
- *produși sanguini* – albumină, trombolitice, fibrinolitice, factori de coagulare (factorii VII, IX, activatorul plasminogen tisular, hirudina recombinant);
- *citokine și factori de creștere* – interferoni, interleukine, factori de stimulare a coloniilor (interferonii α , β și γ , eritropoietină, interleukina-2, GM-CSF, GCSF);
- *anticorpi monoclonali și produși înrudiți*;
- *vaccinuri recombinant* – peptide și proteine recombinant, ADN plasmidial și anti-idiotip (vaccinul HbsAg, vaccinul HPV);
- *enzime recombinant* – α -dornaza (Pulomozym), glucozidaza acidă (Myozim), α -L-iduronidaza (Aldurazim) și urat-oxidaza;
- *alți produși* – proteine morfogene de măduvă, conjugate anticorpi, proteine recombinant pegilate, antagoniști [76].

Totodată, cantitățile mari în care pot fi produse aceste biomolecule recombinant, la un preț de cost mai scăzut decât prin metodele clasice, precum și puritatea lor a permis obținerea unor forme modificate ale lor, cu proprietăți farmacocinetice îmbunătățite. Un exemplu de acest gen îl reprezintă tipurile diferite de insulină umană (prima biomoleculă recombinant, comercializată

începând din 1982): - cu acțiune prelungită; - cu acțiune rapidă; - cu eliberare înceată; - stabilă la acizi etc, (Panda, 2008) [76].

3.1. Realizări ale transgenezei la microorganisme, funghi filamentoși și drojdii

Alegerea unui anumit organism/sistem de obținere a unor proteine terapeutice depinde de o serie de factori, cum ar fi: nivelul de expresie a acestor proteine, calitatea lor, gradul de manipulare a sistemului de producție și evident prețul de cost al produsului. Pentru obținerea unor proteine mai simple, care nu necesită schimbări post-tranlaționale, se folosește bacilul colic (*Escherichia coli*) sau alte bacterii și funghi (*Bacillus subtilis*, specii de *Streptomyces*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, specii de *Aspergillus* etc).

3.1.1. Obținerea de proteine recombinant cu ajutorul bacteriilor manipulate genetic

Sistemul procariot de producere a proteinelor recombinant este recomandat pentru proteine ce nu depășesc 30 kD. Unul dintre cele mai utilizate sisteme de producere a biomoleculilor recombinant îl reprezintă bacilul colic (*E. coli*), pentru că expresia transgenei este rapidă, această bacterie poate fi cultivată pe un mediu relativ ieftin, este ușor de manipulat, iar nivelul de expresie a proteinei poate atinge în jur de 10 g/L, dacă se folosește un promotor puternic și o densitate celulară ridicată în fermentator (Panda, 2008; Kim et al., 2012) [76, 49]. Sistemul prezintă însă și unele dezavantaje: produce proteine neglicozilate, nu poate înlătura secvențele S-S, uneori proteinele de eucariote pot fi toxice pentru bacterii, proteina se acumulează sub o formă denaturată (corpi de incluziune, inactivi și insolubili {care prezintă legături disulfidice inter- și intramoleculare ne-naturale, procesul de renaturare (de reîmpachetare) fiind relativ costisitor (nivelul înalt de expresie a lor compensează însă o parte costuri), densitatea celulară înaltă poate determina formarea de acetati toxici (care poate fi diminuată prin controlul nivelului oxigenului) etc.

Pentru evitarea producerii proteinelor recombinant în citoplasma bacteriei - sub forma corpilor de incluziune, se urmărește secreția lor în spațiul periplasmic al bacteriei sau în mediu, ceea ce s-a și reușit în cazul unor proteine (fosfataza alcalină, fructotransferaza levan, factorul de stimulare al coloniilor granulocitare umane, factorul de creștere tip insulină IGF-1 etc), (Demain și Vaishnav, 2009) [17].

În acțiunea de producere a unor proteine recombinant s-au testat și alte bacterii. Între acestea se numără specii de *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. licheniformis*,

B. megaterium și *B. brevis*. Și sistemele de producere bazate pe manipularea genetică a acestor specii au unele avantaje ca: sunt sisteme bine caracterizate genetic și sigure, au însușiri superioare de creștere, capacitate bună de sinteză și absență a corpurilor intracelulari de incluziune, tehnologiile de transformare genetică sunt bine puse la punct etc, dar au dezavantajul că produc multe proteaze, care pot degrada uneori proteinele recombinant. În timp ce bacilul colic (bacterie Gram-negativă) conține în membrana externă lipopolizaharide (endotoxine ce complică procesul de purificare a proteinelor produse), *B. subtilis* are capacitatea de a secreta și exporta proteinele țintă în mediul extracelular, ceea ce simplifică procesul de separare a produsului de componenții celulari, oferind și condiții mai bune de împachetare a proteinelor decât în citoplasmă. Rezervele legate de folosirea acestei specii în producerea de proteine terapeutice recombinant pleacă de la câteva neajunsuri: a) lipsa unor vectori de expresie adecvați; b) instabilitatea plasmidelor; c) prezența în celule a proteazelor; d) apariția de proteine împachetate greșit (Westers et al., 2004) [117]. Speciile de *Bacillus* sunt folosite în special în producerea de enzime. Au fost selectate tulpini din aceste specii, care produc și secretă extracelular cantități mari de enzime (20-25 g/L), fiind printre cei mai importanți producători industriali de enzime, (Schallmey et al., 2004; Mahmoud, 2007; Degering et al., 2010) [88, 63,16].

Într-o lucrare de sinteză publicată în 2009, Demain și Vaishnav aratău că s-au obținut rezultate notabile și prin folosirea altor specii de bacterii: culturi de *Ralstonia eutropha* au produs organofosfohidrolază cu randamentul de 10 g/L, culturi de *Pseudomonas fluorescens* au produs TNF-alfa în cantitate de 4 g/L, culturi de *Staphylococcus carnosus* și de *Streptomyces lividans* au produs 2 g/L și respectiv 0,2 g/L proteină de mamifere [17].

De altfel, specialiștii în domeniu au testat și alte specii de bacterii ca posibile "fabrici" celulare de producere a unor proteine recombinant, plecând de la diversitatea lor metabolică și de biosinteză, dar și de la capacitatea de adaptare la medii foarte diverse. Iată, după Ferrer-Miralles și Villaverde (2013), unele dintre aceste posibilități [24], (tab. 2).

Tabel nr. 2 - Specii bacteriene explorate ca "fabrici" celulare de producere a proteinelor recombinant (după Ferrer-Miralles și Villaverde, 2013)

Tipul de bacterie	Specia de bacterie	Însușiri principale	Proteine produse
Caulobacterii	<i>Caulobacter crescentus</i>	Purificare ușoară a proteinelor de fuziune RsaA	Proteinele capsidei virusului de necroză hematopoietică; β-1,4-glicanază
Bacterii fototrofe	<i>Rodhobacter sphaeroides</i>	Producție înaltă de proteine de membrană	Proteine de membrană

Bacterii adaptate la frig	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Împachetare îmbunătățită a proteinelor	3H6 Fab
Idem	<i>Shevanella sp., tulp. Ac10</i>	Idem	β-Lactamază, peptidaze, glucozidază
Pseudomonade	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Secreție eficientă	Factorul de stimulare granulocitară la om
Idem	<i>Pseudomonas putida</i>	Idem	Fragmente unicatenare Fv
Idem	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Idem	Penicilin G-acilază
Bacterii halofile	<i>Halomonas elongata</i>	Solubilitate favorizată	β-Lactamază
Idem	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	Idem	Nucleotid difosfat kinază
Streptomicete	<i>Streptomyces lividans</i>	Secreție eficientă	Antigeni <i>M. tuberculosis</i>
Idem	<i>Streptomyces griseus</i>	Idem	Tripsină
Nocardia	<i>Nocardia lactamdurans</i>	Secreție eficientă	Lizin-6--aminotransferază
Micobacterii	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Modificări post-translaționale	Proteina de fuziune Hsp65-hIL-2
Bacterii corineforme	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Nivel înalt de de producție și secreție, GRAS	Protein-glutaminază
Idem	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	Idem	Pro-transglutaminază
Idem	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	Idem	Celulaze
Bacili	<i>Bacillus subtilis</i>	Nivel înalt de de producție și secreție	β-galactozidază
Idem	<i>Bacillus brevis</i>	Idem	Disulfid-izomerază
Idem	<i>Bacillus megaterium</i>	Idem	Anticorpi
Idem	<i>Bacillus licheniformis</i>	Idem	Subtilizină
Idem	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Idem	Amilaze
Bacterii lactice	<i>Lactococcus lactis</i>	Secreție, GRAS	Proteina A de legare-fibronectină, internalină A, GroEL
Idem	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Idem	β-galactozidază
Idem	<i>Lactobacillus casei</i>	Idem	Proteina de fuziune VP2-VP3 a infecției cu virusul necrozei pancreatice
Idem	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Idem	Pediocin-PA-1
Idem	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Idem	Chemokine CC

GRAS – privite în general ca sigure; GroEL – proteine ce aparțin la familia chaperoninei

În ciuda unor avantaje conferite de alte specii de bacterii, care ar putea să se constituie în gazde adecvate pentru producerea de proteine farmaceutice recombinant neglicozilate, *E. coli* rămâne gazda privilegiată în această acțiune, fiind bine cunoscută fiziologia ei în condiții de super-producție, capacitatea ei de a supraviețui în condiții de mediu diverse, este un sistem de expresie stabil, poate să acumuleze proteine recombinant până la 80% din substanța ei uscată etc. S-au identificat totodată o serie de soluții pentru îmbunătățirea procesului de producere a proteinelor recombinant în acest sistem:

- a) folosirea de promotori diverși pentru reglarea expresiei transgenei;
- b) utilizarea unor tulpini diferite ale bacilului colic;

- c) co-exprimarea de molecule chaperon și/sau foldaze;
- d) reducerea temperaturii în sistem;
- e) secreția proteinelor în spațiul periplasmic sau în mediul de cultură;
- f) scăderea ratei de sinteză a proteinei;
- g) schimbarea mediului de cultură;
- h) adăugarea de parteneri de fuziune;
- i) expresia unui fragment din proteină;
- j) denaturarea și replierea (reîmpachetarea) *in vitro* a proteinei (după Demain și Vaishnav, 2009) [17].

Spre sfârșitul anilor 1970 se înregistrau tot mai multe succese în transferul la *E. coli* a unor transgene pentru sinteza de proteine și hormoni de interes medical. Bacilul colic a fost pus la lucru, rând pe rând, pentru a "fabrica": somatostatina umană, somatotropina de șobolan și om, insulina de șobolan și om, ovalbumina din albușul de ou, interferonii, hemaglutinina virusului gripal, factorii plasmatici sanguini VIII și IX implicați în hemofilie la om, antigeni ai virusului hepatitei B etc. Nu vom intra în detalierea acestor realizări pentru că, pe de o parte, ele sunt binecunoscute și le-am prezentat în lucrări anterioare (Ghiorghiță, 1999; Ghiorghiță și Petrescu-Nicuță, 2005) [32, 33], iar pe de altă parte pentru că, așa cum am arătat în capitolul Introducere, în această lucrare ne-am propus să trecem în revistă mai ales realizări ale transgenezei în lumea animalelor și a plantelor.

Pentru a ilustra totuși începuturile ingineriei genetice, reluăm doar două exemple ale acestor realizări de marcă, obținerea cu ajutorul microorganismelor manipulate genetic a unor proteine și hormoni de interes medical. În 1977, Itakura et al. (citați de Sasson, 1988) [87] reușeau să producă *somatostatina* umană prin manipularea genetică a bacilului colic. Acest hormon este o proteină formată din 14 aminoacizi. Autorii au sintetizat chimic un ADN constituit din 52 de aminoacizi, din care 42 codificau cei 14 aminoacizi specifici hormonului, iar restul de 10 asigurau integrarea genei în plasmida pBR-322. Plasmida cu gena străină încorporată în ADN-ul ei a fost transferată apoi în bacilul colic. Pentru ca transgena să se poată exprima, plasmida a fost modelată cu ajutorul restrictazelor EcoRI și BamI, în așa fel încât gena să fie plasată în apropierea operonului "lac" al plasmidei și pusă sub controlul acestuia, la capătul terminal al genei pentru β -galactozidază. Bacteriile transformate genetic, recunoscute pe baza rezistenței la ampicilină și a culorii albastre a coloniilor (datorită prezenței β -galactozidazei), produceau o proteină hibridă "hormon + β -galactozidază", componenții fiind apoi separați prin metode chimice. Tehnologia de producere a

proteinei a fost preluată de către Compania Genentech (SUA). Randamentul de producere a hormonului era de 10.000 molecule/bacterie. Într-un fermentator de 8 litri se obțineau 5mg somatostatină, o cantitate care, prin metodele clasice, era obținută din procesarea a cca 100 tone de creier de oaie [87].

Un succes asemănător s-a înregistrat la scurt timp și în producerea prin inginerie genetică la bacterii a insulinei umane, hormon constituit din 109 aminoacizi, care formează două catene polipeptidice. Conform informațiilor aceluiași autor, în 1979 Crea et al. au sintetizat genele specifice celor 2 catene ale insulinei și le-au inclus într-o plasmidă la extremitatea genei pentru β -galactozidază, care apoi a fost încorporată pentru clonare în bacilul colic, randamentul de producere a hormonului fiind de 100.000 de molecule/bacterie. Ulterior, Gilbert și Villa-Komaroff (1980) obțineau insulina de șobolan, prin izolarea ARNm specific acesteia dintr-o tumoră a celulelor β din pancreas. Cu ajutorul transcriptazei inverse au sintetizat un ADNc corespunzător, l-au inserat în plasmida pBR322 a bacilului colic (în mijlocul genei pentru penicilinază), obținând o proteină hibrid proinsulină+penicilinază, care erau separate cu ajutorul tripsinei. Folosind această tehnologie, firma Ely Lilly (SUA) a fost autorizată în 1982 să producă insulină umană, sub numele de Humulin [87]. Insulina a fost, de altfel, prima proteină recombinant aprobată de USFDA pentru utilizare clinică, în 1980.

Obținerea de proteine terapeutice recombinant cu ajutorul unor microorganisme manipulate genetic a însemnat un progres indiscutabil și remarcabil în satisfacerea nevoilor pieței pentru aceste proteine. Producerea prin metode clasice a unora din ele a fost până nu demult o misiune deloc simplă și deosebit de costisitoare. Doar câteva exemple pentru a ne convinge de această realitate. Potrivit informațiilor prezentate de Mahmoud (2007) [63] într-o lucrare de sinteză referitoare la acest subiect, obținerea prin metode clasice a unei cantități de doar 80 μ g secretină (hormon) umană pură și biologic activă, necesită prelucrarea unei cantități de 3000 kg de intestine de bovine. Între 1922 și 1972 insulina era extrasă din pancreasul de porc și vită din abatoarele de profil. Cantitatea de insulină obținută dintr-un pancreas de porc satisface necesarul pe 3 zile (cca 6 mg insulină pură), a unui diabetic. Între 1970 și 1975 s-a înregistrat un declin în consumul mondial de carne, fapt ce a creat dificultăți și în producerea insulinei prin metodele clasice. A fost momentul când specialiștii au căutat și identificat căi neconvenționale pentru obținerea hormonului, apelând la ingineria genetică a bacilului colic. Ulterior, cu ajutorul culturilor de drojdie de bere (manipulată genetic), s-a ajuns la cca 1500 mg/L

proteină de fuziune SOD-PI (superoxid-dismutază umană/pro-insulină), ceea ce ar însemna cantitatea echivalentă obținută de la 60 de porci [63].

Prin transformarea genetică a bacilului colic, folosind transferul genei pentru somatotropina bovină, firma Monsanto a produs somatotropina bovină recombinant (rBST), hormon aprobat în unele țări pentru administrare la bovine în vederea creșterii producției de lapte. Hormonul se poate regăsi în laptele vacilor, dar nu are efecte asupra omului pentru că este distrus de sistemul digestiv al oamenilor. Totodată, o serie de organizații (USFDA, INSH, OMS, Asociația Medicală Americană etc) au precizat că produșii și carnea acestor animale sunt sigure pentru consumul uman [128]. S-a constatat însă că vacile tratate cu rBST au un risc crescut de a face mastite și diverse infirmități, prezintă o reducere a fertilității și un nivel crescut al factorului de creștere de tip insulină (IGF-1), (care ar fi asociat cu un risc mai mare pentru cancer, în special de sân și prostată). Administrarea hormonului este interzisă în 27 țări UE, dar și în Canada, Japonia, Australia, Noua Zeelandă.

Chiar dacă folosirea bacilului colic ca sistem de expresie a proteinelor terapeutice recombinant a dat roade indiscutabile și este unul dintre cele mai utilizate, el nu poate servi așa cum am precizat deja, la obținerea prin inginerie genetică a oricărei proteine, pentru că are o serie de limite: unele proteine sunt complexe și conțin mai multe subunități, necesită cofactori (grupări protetice), au punți disulfidice, suportă modificări post-tranlaționale (inclusiv glicozilare) pentru a fi funcționale etc, limite pe care acest sistem nu le poate depăși (Mahmoud, 2007) [63]. De aceea s-au investigat ca posibile gazde de producere a unor proteine recombinant și alte specii, ca: fungi, mucegaiuri, drojzii, celule de insecte, celule de mamifere etc.

Cu ajutorul unor microorganisme sau alte celule gazdă manipulate genetic, așa cum a rezultat și din datele inserate în tabelul 2, se obțin și o serie de enzime necesare în prepararea de produse alimentare: *alfa-amilaza* de bacterii (care convertește amidonul în zaharuri), *lactaza* (folosită la reducerea conținutului de lactoză în lapte pentru persoanele care nu tolerează acest glucid), *chimozinul* de bacterii și fungi, *pectinesteraza* de fungi (pentru clarificarea sucului de fructe) etc, (Lemaux, 2008) [54].

3.1.2. Obținerea de proteine recombinant cu ajutorul fungilor filamentoși

Glicozilarea proteinelor, de care depinde în mare măsură funcționalitatea lor, este un proces complex ce se petrece în reticulul endoplasmatic și aparatul Golgi, proces la care participă numeroase și diferite proteine (peste 100). La

bacterii, deci și la *Escherichia coli*, lipsește arsenalul acestor proteine implicate în glicozilare, la drojdii mecanismul este prezent, dar este diferit de cel de la mamifere, iar în celulele mamiferelor (cum ar fi celulele CHO sau umane) este înalt conservat (Dingermann, 2008) [20]. Glicozilarea este o modificare post-translațională comună, în jur de 50% din proteinele eucariotelor fiind glicozilate. Glicanii sunt sintetizați prin intervenția unor enzime ca glicoziltransferaze, glicozidaze și alte enzime care sintetizează și remodelează lanțurile glican, ca și enzime accesorii implicate în sinteza și transportul zaharurilor nucleotidice (Deshpande et al., 2008) [18]. Glicanii N-linkați joacă rol important într-o serie de procese fiziologice normale și patologice, cum ar fi traficul celular și al proteinelor, imunogenitatea, creșterea celulară, diferențierea, invazia tumorală, semnalizarea trans-membranară, interacțiunile gazdă-patogen (Zhao et al., 2008 – citați de Nevalainen și Peterson, 2014) [72]. Glicozilarea are loc fie prin atașarea unui glican la un rest de asparagină al unei proteine – caz în care se numește N-glicozilare, fie la hidroxilizină, hidroxiprolină, serină sau treonină – când se numește O-glicozilare (Deshpande et al., 2008) [18].

Gama proteinelor farmaceutice recombinant obținute în sistemele de expresie reprezentate de fungi, drojdii, celule de insecte și de mamifere etc, este largă, cuprinzând: hormoni, interleukine, interferoni, factori de creștere hematopoietică, factori de coagulare a sângelui, medicamente trombolitice, factori de necroză tumorală, anticorpi monoclonali (din generația a II-a), vaccinuri, enzime. Ele au traversat mai multe generații. Proteinele recombinant din prima generație au reprezentat structuri similare cu cele produse în organism; în generația a II-a ele au fost modificate prin atașarea covalentă a unor compuși chimici, schimbări ale secvenței proteice, fuziunea a două sau mai multe lanțuri peptidice, înlocuirea unor resturi glucidice etc, fapt ce le-a conferit proprietăți îmbunătățite (în special farmacocinetice), biodistribuție, specificitate și eficacitate mai ridicată, cu efecte secundare minime; medicamentele recombinant din generația a III-a sunt o provocare și ele vor însemna noi căi de administrare, noi formule și evident o eficiență și securitate sporite. Utilizarea acestor medicamente se adresează unui spectru larg de afecțiuni: diabet, infarct miocardic, insuficiență cardiacă congestivă, scleroză multiplă, atac cerebral, anemie, neutropenie, trombocitopenie, hepatită, artrită reumatoidă, astm, terapia cancerului, boala lui Crohn (Zerek și Rozga, 2012) [125].

Prezentăm în tabelul 3 unele medicamente recombinant existente pe piață și maladiile umane pentru care sunt indicate. Aceste proteine/peptide sunt prezentate pe două categorii: a) din generația a I-a, care conțin structuri bazate

pe cele naturale, identice celor din țesuturile corpului; b) din generația a II-a, produși cu proprietăți îmbunătățite [125].

Tablel nr. 3 - Proteine recombinant utilizate în terapeutică
(după Zerek și Rozga, 2012)

Proteine recombinant din prima generație

Denumirea/Brandul	Generic	Compania producătoare	Categoria terapeutică	Indicații terapeutice
Humulin	Insulină	Eli Lilly	Diabet	Diabet
Humatrope	Somatropină	Eli Lilly	Hormon	Deficiențe creștere
Gonotropin	Idem	Pfizer	Idem	Idem
Saizen	Idem	Serono	Idem	Idem
Nutropin/Protropin	Somatropin/Somatrem	Genentech	Idem	Idem
Intron A	Interferon α -2b	Shering-Plough	Antiinfecțios	Infecții virale
Avonex	Interferon β -1a	Biogen Idec	Scleroză multiplă	Polineuropatie inflamatorie cronică
Betaseron/Betaferon	Interferon β -1b	Shering AG	Scleroză multiplă	Scleroză multiplă
Procrit/Eporex	Epoetină alfa	J & J	Modificator sanguin	Anemie
Epogen	Epoetină alfa	Amgen	Idem	Idem
NeoRecormon	Epoetină beta	Roche	Idem	Idem
Kogenate	Factorul VIII	Bayer	Idem	Hemofilie
NovoSeven	Factorul VIIa	Novo Nordisk	Idem	Idem
Benefix	Factorul IX	Wyeth	Idem	Idem
Fabrazyme	Beta agalazidază	Genzyme	Enzime	Boala Fabry
Replagal	Alfa agalazidază	TKT Europe	Idem	Idem
Pulmozyme	Alfa dornază	Genentech	Idem	Fibroză chistică
Activase/Actilyse	Alteplază	Idem	Factor sanguin	Infarct miocardic

Proteine terapeutice din generația a II-a

Humalog/liprolog	Insulina lispro	Ely Lilly	Diabet	Diabet
Lantus	Insulina Glargin	Sanofi-Aventis	Idem	Idem
Levemir	Insulina datemir	Novo Nordisk	Idem	Idem
Pegasys	Interferon pegylat α -2a	Roche	Interferon	Hepatită C
Peg-Intron	Idem	Shering Plough	Idem	Idem
Aranesp	Darabepoetina alfa	Amgen	Modificator sanguin	Anemie
Neulasta	PEG-Filgrastim	Idem	Idem	Neutropenie
ReFacto	Factorul VIII	Wyeth	Idem	Hemofilie
Amevive	Alefacept	Biogen Idec.	Inflamație/oase	Placă psoriazică
Enbrel	Etanercept	Amgen	Antiartritic	Artrită
Ontak	Toxina diferetică- rIL2	Ligand farmaceutic	Cancer	Cancer

Anticorpi monoclonali

ReoPro	Abciximab	Ely Lilly	Modificator sanguin	Sindrom acut coronarian
Rituxan	Rituxumab	Genentech	Cancer	Limfom non-Hodgkin
Herceptin	Trastuzumab	Idem	Idem	Cancer de sân
Synagis	Polivizumab	MedImmune	Respirator	Virusul sincițial respirator
Campath	Alemtuzumab	Shering AG	Cancer	Limfom non-Hodgkin
Humira	Adalimumab	Abbott Labs	Antiartritic	Artrită reumatoidă
Xolair Omalizumab	Omalizumab	Genentech	Boală respiratorie	Astm pediatric, Alergii la arahide
Erbix	Cetuximab	Imclone Systems	Cancer	Cancer de colon
Avastin	Bevacizumab	Genentech	Idem	Idem

Fungii filamentoși, precum *Aspergillus niger*, *A. oryzae* și *Trichoderma reesi* au devenit adevărate "fabrici" pentru obținerea unor proteine recombinant, în special enzime de origine fungică. Acești fungi au avantajul că posedă un sistem eficient de secreție, au capacitatea de glicozilare a proteinelor și au rate de creștere mai ridicate chiar decât celulele vegetale, de insecte sau de mamifere. Deși fungii pun o serie de probleme privind mixarea și aerarea culturilor, comparativ cu bacteriile și drojdiile, s-au dezvoltat și în cazul lor tehnologii eficiente de fermentare (Wiebe, 2003) [121].

Citând o serie de autori, Demain și Vaishnav (2009) arătau că transformanții de *Aspergillus awamori* produceau extracelular lactoferină umană în cantitate de 2 g/l și glucoamilază de *A. niger* - 4,6 g/l, cei de *A. oryzae* produceau 2 g/l lactoferină umană și 3,3 g/l renină de *Mucor* sp., cei de *Acremonium chrisogenum* produceau 4 g/l de protează alcalină de *Fusarium*, iar producția de enzime recombinant de către tulpinide *Trichoderma reesi* a atins niveluri de 35 g/l. Verdoes et al. (2007), citați de aceiași autori, au transformat genetic fungul *Chrysosporium lucknowense* pentru a produce cantități mari de proteine și cantități scăzute de proteaze, Compania Dyadic International Inc raportând niveluri de producție de până la 100g/l proteine [17].

Dacă fungii filamentoși sunt mai puțin productivi ca gazde de expresie pentru unele proteine (cum ar fi anticorpii monoclonali), comparativ cu celulele de mamifere, ei apar redutabili când vine vorba de producerea industrială a unor enzime (Nevalainen și Peterson, 2014) [72]. În tabelul 4 sunt prezentate exemple de enzime produse industrial prin folosirea ca gazde a fungilor filamentoși recombinant.

Tabel nr. 4 - Enzime disponibile comercial, produse de către fungi filamentoși recombinant (după Wiebe, 2003)

Enzima	Organismul gazdă	Organismul sursă	Industria de aplicare
Aminopeptidază	<i>Trichoderma reesi</i> sau <i>T. longibrachiatum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Alimentară ^a și de furaje ^b
Catalază	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Alimentară ^{c, d}
Celulază	<i>T. reesi</i> , <i>T. longibrachiatum</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Humicola</i> sp., <i>Thielavia</i> sp., <i>Myceliophthora</i> sp.	Textile ^d , detergenți, celuloză, hârtie
α - Galactozidază	<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	De furaje ^e
β - Glucanază	<i>T. reesi</i> , <i>T. longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	Textile ^{e, f} și de furaje ^f
Glucoamilază	<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Alimentară ^{h, i}
Glucooxidază	<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Alimentară ^{d, j}
Laccază	<i>A. oryzae</i>	<i>Myceliophthora</i> sp. <i>Polyporus</i> sp.	Textile ^k
Lactază	<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Alimentară ^l
Lipază	<i>A. oryzae</i>	<i>Candida</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizomucor</i> sp., <i>Thermomyces</i> sp.	Alimentară ^{d, m} , textile ⁿ , detergenți ^o , pielărie ^p , celuloză și hârtie ^v

Mannanază	<i>T. reesi, T. longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	Alimentară ^f
Pectin-liază	<i>A. niger, A. oryzae, T. longibrachiatum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Alimentară ^f , de furaje ^f și textile ^s
Pectinază	<i>T. reesi, T. longibrachiatum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Idem
Pectinesterază	<i>A. niger, A. oryzae, T. reesi</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Idem
Fosfolipază A	<i>T. reesi, T. longibrachiatum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Alimentară ^{d, t} , de furaje ^f și textile
Fosfolipază B	<i>T. reesi, T. longibrachiatum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Alimentară ^{d, t} și de furaje ^f
Fitază	<i>A. niger, A. oryzae, T. reesi</i>	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Penophora</i> sp.	De furaje ^f
Protează	<i>A. niger, A. oryzae</i>	Stomac de vițel, <i>Aspergillus</i> sp., <i>Rhizomucor</i> sp.	Alimentară ^m și de pielărie ^{p, u}
Pullulanază	<i>T. reesi, T. longibrachiatum</i>	<i>Hormoconis</i> sp.	Alimentară ^d și de furaje ^f
Xilanază	<i>A. niger, A. oryzae, T. reesi, T. longibrachiatum</i>	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Thermomyces</i> sp. <i>Actinomadura</i> sp.	Alimentară ^d și de furaje ^f

a) reduce amăreala la digestia proteinelor în industria de brânzeturi, ouă, carne și lapte; b) alimente pentru animale (gustul); c) industria de brânzeturi, ouă, amidon, grăsimi, zahăr, sterilizarea la rece a laptelui; d) aplicații la copt; e) prelucrarea textilelor; f) creșterea valorii nutriționale a alimentelor din porc/pui; g) tratarea cănepei, iutei, inului etc, pentru prelucrarea textilelor, frânghiilor; h) producerea de siropuri cu conținut ridicat de fructoză/glucoză; i) clarificarea sucurilor, vinului, berei; j) stabilizarea alimentelor și băuturilor, îmbunătățirea făinei; k) decolorarea culorilor, precum indigo; l) produse lactate (ex. iaurt) și producerea siropului de lactoză; m) maturare și aromă brânză; n) creșterea înmuierii; o) înlăturarea culorii; p) în timpul înmuierii și degresării; r) prelucrarea fructelor; s) îndepărtarea substanțelor ne-celulozice din bumbac; t) producerea de lizo-lecitină (ex. pentru margarină); u) calcifiere, decalcifiere înmuiere; v) îndepărtarea smoalei

Un exemplu spectaculos de reușită în domeniul obținerii pe căi neconvenționale a unor enzime industriale, îl reprezintă *chimozinul*. În locul cheagului extras din stomacul vițelilor tineri (neînțărcați) și folosit în prepararea brânzeturilor, este produs în prezent cu ajutorul unor microorganisme manipulate genetic, *chimozinul B* (FPC – *fermentation produced chymosin*). Substratul pentru chimozin (renină) este cazeina-K din lapte, iar produsul rezultat din acțiunea lui este fosfocazeinatul de calciu. La începutul anilor 1960 cererea de brânzeturi pe piață a crescut, implicit și prețul cheagului necesar la fabricarea lor, fapt ce a determinat identificarea de surse alternative de cheag pentru coagularea laptelui. Sunt microbi și plante care fabrică enzime cu proprietăți coagulante, numai că aceste enzime pot produce unele reacții secundare, care influențează negativ gustul brânzeturilor, (Lim, 2014) [56]. Spre sfârșitul anilor 1980 cercetătorii au optat pentru producerea prin inginerie genetică a cheagului necesar în industria de brânzeturi. În acest scop, au fost izolate genele specifice chimozinului din stomacul de vițel și au fost transferate fie în fungul *Aspergillus niger* (produsul obținut fiind comercializat pe piață de firma daneză Chr. Hansen sub numele de CHY-MAX), fie la drojdia *Kluyveromyces lactis* (FPC obținut fiind comercializat de firma germană DSM sub numele de MAXIREN) [128]. FPC a fost declarat produs sigur de către FDA în 1990 și considerat echivalent cheagului din stomacul de vițel, iar în

prezent cca 90% din brânzeturile comercializate în SUA sunt obținute folosind acest cheag transgenic [56]. În august 2007, FDA a recunoscut ca sigur și chimozinul produs prin inginerie genetică de către *Trichoderma reesei*.

O problemă serioasă cu care se confruntă producerea biotehnologică a unor proteine recombinant (nu numai în cazul fungilor ca gazde, dar și a bacteriilor și drojdiilor) este fenomenul de proteoliză, care poate degrada aceste proteine. În acest sens s-au căutat soluții care să înlăture sau să diminueze procesul. Între acestea se numără obținerea - prin mutageneză experimentală sau prin metode moleculare, a unor tulpini deficiente în diferite proteaze, aceste tulpini fiind apoi folosite ca gazdă în producerea proteinelor recombinant de interes. Se pot lua de asemenea măsuri ce vizează condițiile de cultivare a acestor organisme, care pot favoriza sau inhiba sinteza unor proteaze (Wiebe et al, 2003) [121]. Bunăoară, proteazele de fungi sunt inhibitate de prezența în exces a ionului de amoniu. În culturile de *Aspergillus niger* recombinant pe mediul Vogel standard s-a produs o cantitate de 0,07 μg/L de activator plasminogen tisular (tPA), iar dacă mediul de cultură era suplimentat cu o cantitate de 10 ori mai mare de sulfat de amoniu, atunci cantitatea de tPA activ a fost de 1,41 μg/L [121]. Reducerea cantității unor proteaze sau inactivarea lor se poate realiza și prin schimbarea pH-ului la care sunt cultivate miceliile, sau prin reducerea temperaturii de cultivare (care influențează însă și producția de proteine), suplimentarea mediului cu anumiți inhibitori de proteaze etc. De exemplu, *A. niger* producea în cantități mari glucoamilază recombinant pe un mediu complex la un pH de 4,0 - dar această capacitate de sinteză a enzimei se pierdea la un pH de 5,4 (Swift et al., 2000 – citați de Wiebe et al., 2003) [121].

3.1.3. Obținerea de proteine recombinant cu ajutorul drojdiilor

Sisteme eficiente de producere a proteinelor recombinant sunt și drojdiile, mai cu seamă că îmbină unele avantaje conferite de organismele unicelulare procariote (cum ar fi însușirile de creștere și o manipulare genetică ușoară) cu capacitatea de procesare a proteinelor specifică eucariotelor (împachetarea și asamblarea lor, modificările post-tranlaționale ale proteinelor), precum și lipsa endotoxinelor și a ADN viral sau oncogenic (Porro et al., 2005) [81]. Ele pot produce proteine ce depășesc 50 kD, în cantități mari și la un preț de cost scăzut, pot înlătura secvențele semnal, pot realiza anumite tipuri de glicozilări, produc chaperonine necesare împachetării unor proteine, pot prelucra proteinele bogate în S-S (Demain și Vaishnav, 2009) [17]. Culturile de drojdiile au avantajul că sunt mai productive (recoltă mai mare) și mai economice, comparativ cu sistemele de expresie reprezentate de alte eucariote (cum ar fi celulele de insecte infectate de

baculovirus (BEVS) sau celulele CHO), dar au dezavantajul că nu pot realiza unele modificări post-tranlaționale complexe, cum ar fi – prolil-hidroxilarea și amidarea, unele tipuri de fosforilare și glicozilare (procese specifice de specie, țesut și chiar de tip celular), (Balamurugan et al., 2007) [6].

Modelul de glicozilare a proteinelor de către drojzii este diferit de al eucariotelor superioare (mamifere, de exemplu), drojdiile având capacitatea de a adăuga proteinelor jumătăți carbohidrat O- și N-linkate. O-oligozaharidele de *P. pastoris* sunt însă reprezentate de resturi de manoză, în timp ce la mamifere ele sunt constituite din acid sialic, galactoză și N-acetil-galactozamină (Fickers, 2014) [25]. Unii autori au reușit să manipuleze genomul acestei levuri, care s-o ”umanizeze”, adică s-o determine să realizeze modificări post-tranlaționale ale proteinelor, de tipul celulelor de mamifere. Se consideră că tulpinile glicomanipulate ale drojdiei vor putea controla strict glicozilarea produsului final, în acest fel fiind ameliorate clinic și proprietățile proteinei și că, în loc de obținerea unui amestec de glicoforme – cum e cazul celulelor de mamifere, prin intermediul acestor tulpini de drojzii se vor putea produce glicoproteine cu un singur tip de N-glicozilare (Gerngross, 2004) [28].

Între drojzii, *Saccharomyces cerevisiae* (drojdia de bere) a fost prima testată de către specialiști, fiind bine cunoscute genetica și fiziologia ei. Printre produșii de pe piață ”fabricați” de drojdia de bere se numără: insulina, antigenul de suprafață al hepatitei B, urat-oxidaza, glucagonii, factorul GM-CSF, factorul de creștere derivat plachetar (Demain și Vaishnav, 2009) [17]. S-a dovedit însă că drojdia de bere nu este cea mai bună gazdă pentru expresia de proteine heteroloage pentru că reclamă un echipament sofisticat de fermentare, proteinele produse sunt frecvent hiperglicozilate și adeseori se observă că produsul țintit se acumulează în spațiul periplasmic (Porro et al, 2005) [81], de aceea s-au testat ca gazde de expresie și unele drojzii ”neconvenționale”.

Drojdiile metilotrofe, au devenit astfel gazde mai atractive în producerea de proteine recombinant, deoarece au promotori de expresie puternici și strict reglați pentru genele ce codifică aceste proteine. În plus, celulele lor cresc rapid și la densități foarte mari (care pot atinge 130 g/L), nivelul de expresie a produsului vizat fiind reglat prin manipulări ale mediului de cultură. Avantajele folosirii drojdiilor metilotrofe ca gazde de clonare față de drojdia de bere ar consta în:

- productivitate mai înaltă de sinteză a proteinelor;
- evitarea hiper-glicozilării;

- creșterea în soluții metanolice rezonabile, care ar ucide alte microorganisme;
- reprezintă un sistem ieftin de montare și întreținere;
- se pot obține transformanți stabili, care au integrate în cromosomi mai multe copii ale transgenei (Gellison et al, 1992 – citat de Demain și Vaishnav, 2009) [17].

Specia *Pichia pastoris* este larg folosită ca sistem de producere a proteinelor recombinant, pentru că:

- posedă o rată de creștere rapidă și capacitate de fermentație la densitate celulară ridicată;
- are niveluri înalte de productivitate, în mediu aproape lipsit de proteine;
- evită contaminarea cu endotoxine și bacteriofagi;
- este ușor de manipulat genetic având vectori de expresie bine caracterizați;
- este absentă vreo patogenitate umană cunoscută din spectrul virusurilor litice care să invadeze *P. pastoris*;
- este un sistem capabil de diverse modificări post-tranlaționale (care includ împachetarea polipeptidului, glicozilarea, metilarea, acilarea, ajustarea proteolitică);
- secretă proteinele în mediu (ceea ce facilitează operația de purificare a lor), nefiind necesară recoltarea celulelor de drojdie, (Li et al., 2007 – citați de Weinacker et al., 2013) [115].

Această drojdie prezintă un nivel ridicat de expresie a proteinelor, este ușor de întreținut, crește mai rapid, este un sistem mai puțin costisitor decât alte sisteme eucariote etc. În plus, sistemul de expresie *Pichia* dispune de un șir larg de promotori, de markeri de selecție, de semnale de secreție, o bună cunoaștere a modelelor de glicozilare etc (Macauley-Patrick et al., 2005 – citați de Weinacker et al., 2013) [115].

Se apreciază că din 1984 peste 300 de proteine heteroloage au fost exprimate în *P. pastoris* (Cregg et al, 2000 și Cereghino și Cregg, 2000 – citați de Balamurugan et al., 2007) [6]. Printre acestea se numără: antigenul Mb95 de la *Boophilus microplus*, fragmentul C al toxinei tetanosului, proteina P69 de *Bordetella pertusis* (cu proprietăți imunologice), o subunitate a genei gD de la virusul-1 herpes bovin (ca vaccin împotriva acestui virus), proteina gD a virusului-1 ecvin, proteina de tip 6L1 a virusului papilloma uman (care a facilitat dezvoltarea vaccinului HPV), vaccinurile virale recombinant polio și

dengue, proteina recombinant ORF2 a virusului hepatitei virale E (care a indus un răspuns imun puternic la șoarece etc [6].

Citând o serie de autori, Demain și Vaishnav (2009) [17] arată că *P. pastoris* poate produce cantități ridicate ale unor proteine recombinant umane în mediul extracelular, după cum urmează: 4 g/L interleukină-2 și 4 g/L serum albumină (Cregg et al., 1993); 6 g/L TNF (Dale et al., 1999) și alte proteine heteroloage (Macaully-Patrick et al., 2005); 300mg/l/zi de chitinază umană recombinant (Goodrick et al., 2001); 12 g/L de fragment C al toxinei tetanice (Clare et al., 1991). Între proteinele recombinant de interes medical, produse în sistemul *P. pastoris*, se numără și: insulina precursor (1,5 gL⁻¹), serum albumina umană (6 gL⁻¹), TNF (10 gL⁻¹), varianta de hirudină HV2, inhibitor al coagulării (1,5 gL⁻¹), hormonul interferon τ (0,28 gL⁻¹), proteina antigen a citomegalovirusului (0,1 gL⁻¹), receptorul serotonin 5HT_{5A} (22 pmol/mg proteină de membrană), receptorul μ -opioid uman (400 mol/mg proteină), (date citate după Fickers, 2014) [25]. Și în cazul speciei *P. pastoris* (ca și la fungii filamentoși) s-au identificat căi prin care să se asigure acumularea în cantități mai mari a produsului țintit, între care se numără:

- reducerea proteolizei prin scăderea temperaturii de cultivare;
- o proteoliză mai scăzută prin diminuarea morții celulare și a eliberării de proteaze în mediu;
- o rată mai înaltă de sinteză datorată unei activități mai ridicate a alcool oxidazei (Jahic, 2003) [44].

Dacă serum albumina recombinant a fost produsă de către drojdia de bere cu randamentul de 0,15 g/L, celulele de *P. pastoris* o produceau la nivelul de 10 g/L (Nevalainen et al, 2005 – citați de Demain și Vaishnav, 2009) [17]. Și *Pichia* ca sistem gazdă de producere a proteinelor recombinant are limite, atunci când este cazul unor proteine care necesită chaperoni pentru împachetare. *P. pastoris* reprezintă un sistem în care pot fi produse și unele enzime recombinant (tab. 5).

Tabel nr. 5 - Enzime recombinant produse în culturi de *Pichia pastoris* (după Fickers, 2014) [25]

Enzima	Originea (specia)	Cantitatea produsă
Xilanază		
Endo- β -1,4-xilanază	<i>Aspergillus niger</i>	60 mgL ⁻¹
Endo- β -1,4-xilanază termostabilă	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	148 mgL ⁻¹
Endo- β -1,4-xilanază acidofilă	<i>Aureobasidium pullulans</i>	178 mgL ⁻¹
Celulază		
Carboximetilcelulază	<i>Cryptococcus</i> sp.	-
Endo- β -1,4-glucanază	<i>Valvariella volvacea</i>	65 mgL ⁻¹

Protează Protează aspartică Protează alcalină Serin protează termostabilă	<i>Mucor pusillus</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Thermomonospora fusca</i>	- 513 mgL ⁻¹ 135 UI ⁻¹
Lipază Lipaza Lip2p Lipază Lipază B	<i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Candida antarctica</i>	630 mgL ⁻¹ 184 UI ⁻¹ 44 mgL ⁻¹
Amilază α -amilază salivară α -amilază α -amilază	Șoarece <i>Bacillus alcalofil</i> <i>Thermobifida fusca</i>	0,24 mgL ⁻¹ 50 mgL ⁻¹ 510 UI ⁻¹
Fosfatază Fosfatază alcalină Fosfatază Serin/treonin fosfatază tip 1	Placentă umană Noduli radiculari de soia Drosophila	2 mgL ⁻¹ 10 mgL ⁻¹ 10 mgL ⁻¹
Pectinază Pectateliază Pectateliază	<i>Fusarium solani</i> <i>Bacillus subtilis</i>	- 100 UI ⁻¹
Fitază PhyA Fitază-6' Fitază SK-57	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penyophora lycii</i> <i>Aspergillus niger</i>	63 mgL ⁻¹ 10.540 Uml ⁻¹ 865 Uml ⁻¹
Lacază Lacază Lacază B	<i>Pycnopus sanguineus</i> <i>Trametes sp.</i>	28 mgL ⁻¹ 32 Uml ⁻¹

În producerea de proteine heteroloage au fost testate ca gazde și alte specii de drojdii. Într-o lucrare dedicată acestui subiect, Dominguez et al. (1998) [21] arătau că pe lângă chimozin, specia *Kluyveromyces lactis* a servit ca sistem de expresie și pentru serum albumina umană (cca 3 g/l), α -galactozidază, interleukina-1 β umană, α -amilaza de șoarece, D-amino-acid-oxidază etc. Specia *Yarrowia lipolytica* a fost manipulată genetic pentru a produce în mediu o protează alcalină (XPR2), anafilatoxina C5a umană, pro-chimozinul bovin, α -interferonul porcine și factorul de coagulare uman XIIIa. Specia *Hansenula polymorpha* a fost folosită ca sistem de expresie pentru antigenii de suprafață S și L ai virusului hepatitei B, pentru hirudină etc, [21].

3.2. Realizări ale transgenezei la animale

Drumul către transgeneză la animale a fost deschis de Gordon et al., (1980) [34], care au folosit în acest scop ca tehnică microinjectarea. Un animal manipulat genetic a fost definit de către Consiliul canadian pentru îngrijirea animalelor ca fiind "un animal la care a avut loc o schimbare în ADN-ul lui nuclear sau mitochondrial (adiția, deleția sau substituția unei părți din materialul lui genetic sau inserția de ADN străin) realizată printr-o intervenție tehnologică umană deliberată" (Ormandy et al., 2011) [75].

În general, indiferent de specie, pentru obținerea de animale transgenice sunt parcurse următoarele etape:

- identificarea și construirea transgenei și a secvențelor promotor;
- introducerea, prin diverse metode, a ADN străin în pronucleul unui singur ovocit fertilizat;
- implantarea acestor celule manipulate genetic într-o mamă surrogat;
- urmărirea dezvoltării la termen a embrionului și verificarea încorporării stabile a transgenei și a transmiterii ei la descendenți;
- demonstrarea faptului că gena este astfel reglată încât poate funcționa în organismul receptor (Bagle et al., 2013) [5].

Se apreciază că procesul de modificare (manipulare) genetică la animale este unul lent, dificil și costisitor [133]. Animalele modificate genetic au fost "proiectate" pentru a servi la o serie de obiective, ca:

- dezvoltarea de modele animale pentru studiul unor boli umane;
- producerea de bunuri industriale (fibre, de exemplu) sau de consum;
- producerea unor substanțe de uz terapeutic uman sau surse pentru transplanturi de țesuturi și organe;
- îmbunătățirea interacțiunii dintre animale și om (animale de companie hipo-alergenice);
- ameliorarea producției sau calității unor însușiri (de exemplu: pești ce cresc mai rapid, sau porci care digeră hrana mai eficient etc);
- îmbunătățirea sănătății animalelor (a rezistenței lor la boli, de exemplu) etc, [133].

Se pune o întrebare firească, de ce animale transgenice? În primul rând, pentru realizarea unora din dezideratele prezentate anterior. În al doilea rând, pentru că unele proteine umane complexe, cum ar fi anticorpii monoclonali sau factorii sanguini de coagulare, nu pot fi produse prin ingineria genetică a bacteriilor. Pentru a fi active (mature), aceste proteine trebuie să suporte – cum s-a mai spus deja, unele modificări post-tranlaționale, iar bacteriile nu conțin enzimele specifice pentru astfel de schimbări. Printre proteinele recombinant umane produse de animalele transgenice se pot enumera: factori sanguini, colagen, fibrinogen, hormoni, hemoglobină, serum-albumină, lactoferină, activatorul plasminogen tisular (tPA), anticorpi monoclonali, vaccinuri, enzime, citokine, factori de creștere etc (Houdebine, 2009; Hunter et al., 2005 - citați de Bagle et al., 2013) [5]. Animalele folosite frecvent în acest scop sunt: porcii, vacile, oile, caprele. Trebuie precizat că există diferențe tehnice între obținerea de celule (linii celulare) de mamifere transformate genetic și de animale întregi

transgenice și acestea constă în primul rând în metoda de selecție a celulelor și respectiv a embrionilor modificate genetic. Dacă în culturile de celule de mamifere selecția celulelor transformate se poate baza pe gene de rezistență la medicamente, incluse în vectorul de expresie, pentru reușita operației de transgeneză a embrionilor ce urmează a fi implantați în uterul animalului receptor nu există deocamdată metode de identificare (selecție), de aceea, și randamentul de obținere a animalelor transgenice este în general scăzut.

Experiențe de transgeneză la animale se efectuează pe cele mai diverse organisme, de la nevertebrate până la mamifere. Dintre nevertebrate menționăm: artropode ca *Drosophila melanogaster*; moluște ca *Halotis diversicolor suportexta*, *Crassostrea virginica*, *Mulinia lateralis*. Gama vertebratelor supuse operațiilor de transgeneză este și mai variată: în cazul peștilor amintim *Salmo salar*, *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, *Danio rerio*, *Oreochromis niloticus* etc; a amfibienilor – *Xenopus laevis* și *X. tropicalis*; a păsărilor – *Gallus gallus* și *Coturnix japonica*; a mamiferelor – pe lângă cele menționate deja adăugăm șoarecii, șobolanii, iepurii, câinii, unele maimuțe (*Callithrix jacchus*, *Macaco mulatta*) etc, (Gama Sosa et al., 2010) [26].

Pe lângă obținerea unor proteine recombinant, transgeniza la animale urmărește și alte obiective: la bovine - obținerea de animale rezistente la encefalopatia spongiformă sau la mastita stafilococică; la porci - obținerea de organe pentru xenotransplantare la om; puii transgenici - pot fi modele utile în studiul retinitei pigmentare și a bolii Alzheimer; iepurii și șobolanii transgenici - modele pentru studiul unor boli umane etc. Porcul apare ca animal favorit pentru operațiile de transplant de organe la om prin faptul că are o anatomie, fiziologie și dimensiuni ale organelor asemănătoare omului, iar cheltuielile de întreținere, la standarde înalte de igienă, sunt mici. S-au imaginat, în acest sens, și strategii de reducere pe termen lung a reacției de respingere hiperacută. Porcul apare ca model util și în studiul deficiențelor de eliberare a hormonului de creștere uman (întâlnite în sindromul Turner, hipocondroplazie, întârzierile de creștere intrauterină). Totodată unele celule porcine ar putea fi de folos în tratarea unor oameni bolnavi, cum ar fi utilizarea celulelor insulare porcine în tratarea diabetului la om, sau a celulelor neuronale fetale porcine în tratarea unor boli neuro-degenerative umane (boala Parkinson, Huntington etc), (Bagle et al., 2013) [5].

Există totuși unele riscuri (chiar dacă sunt mici) asociate transplantării de celule și organe de la animale la om. Pot fi transmise în acest fel unele boli zoonotice grave cum ar fi encefalopatia spongiformă bovină, retroviruși

endogeni porcini și encefalita Nipah. Este și motivul pentru care USFDA a interzis încercările de xenotransplantare pe primat non-umane până când procedurile folosite nu se vor dovedi sigure, iar problemele de etică să fie dezbătute public (MacDonald Glenn, 2013) [60].

Trebuie reținut faptul că, deși sunt așteptări mari de la producerea cu ajutorul animalelor de fermă a unor proteine recombinant, tehnologia de obținere a animalelor transgenice este costisitoare, laborioasă, dificilă din punct de vedere tehnic, este încă în faza de început și se confruntă cu numeroase dificultăți și limite de depășit. Ea reclamă mii de injecții de ovocite fertilizate (manipulate genetic) pentru a obține un animal transgenic. Referitor la costurile de obținere și de întreținerea unui animal transgenic, se apreciază că pentru generarea unui porc transgenic ele s-ar ridica la cca 20.000\$ SUA, iar pentru o vacă transgenică la cca 250.000\$ (Kind și Schniecke, citați de Gama Sosa et al., 2010). Alte calcule de acest gen estimează costuri și mai mari, de cca 60.000 \$ SUA în cazul unei oi transgenice (pentru o genă) și de cca 550.000 \$ SUA în cazul unei vaci transgenice (Wall et al., 1992 – citați de Mahmoud, 2007).

Cele mai multe experiențe și succese în transgeneza animalelor s-au obținut pe șoareci. În 1987 a fost obținut un șoarece transgenic, ce exprima în lapte tPA, apoi în 1990 un șoarece care producea în lapte α -antitripsina [148].

Motivele pentru care șoarecii sunt "favorizați" în acțiunile de transgeneză sunt lesne de înțeles: ei au un timp de gestație scurt (18,5 – 21 zile), o prolificitate bună, sunt ușor de întreținut, peste 80% din genele lor funcționează ca la om și, în plus, tehnicile de transgeneză la această specie sunt bine puse la punct și disponibile (Gama Sosa et al., 2010) [26]. Primul șoarece transgenic a fost realizat în 1981 și avea încorporată în genomul lui o genă susceptibilă de producerea cancerului la om.

Pentru studiul unor boli umane există în prezent: *Șoarece SIDA* (primul șoarece HIV a fost obținut în 1991, iar în prezent există 32 astfel de modele, care exprimă proteine HIV-1 și dezvoltă simptome de imunodeficiență asemănătoare cu SIDA la om); *Șoarece Alzheimer* (diverse modele: pentru patologia amiloidă, șoarece TAU, pentru presenilină, ApoE KO etc); *Onco-șoarece* (șoarece patentat de Compania DuPont, care conține o oncogenă umană activată, introdusă într-un stadiu embrionar timpuriu, care asigură astfel prezența ei în toate celulele animalului); *Șoarece Tânăr* (care trăiește cu 20% mai mult decât cel obișnuit), *Șoarece rezistent la influența* (care produce în exces *proteina Mx*, cu efect antiviral); *Super-șoarece* (șoarece de dimensiuni mult mai mari decât cel obișnuit); modele de șoarece transgenici pentru studiul

angiogenezei (inhibarea angiogenezei pare a fi o cale în noile terapii împotriva cancerului), pentru studiul diabetului etc [5, 23,148]. De perspectivă pentru modelarea unor boli umane par să fie și alte două specii: iepurii și șobolanii. Totodată, prin adăugarea sau deleția unor gene la animale de experiență, se pot obține informații importante despre activitatea acestora și se vor înțelege mai bine unele boli umane în care sunt implicate anumite gene, precum și modul de a trata aceste boli.

Se speră de asemenea ca prin transgeneză la animale să se îmbunătățească acele caractere de producție care au ereditabilitate scăzută (cum ar fi, de exemplu, numărul de purcei/scroafă). Se așteaptă ca tehnicile de inginerie genetică să contribuie și la îmbunătățirea carcasei și calității cărnii la animale, prin creșterea procentului de carne în carcasă, diminuarea procentului de grăsimi și ameliorarea compoziției în acizi grași a cărnii, prin creșterea conținutului în acizi grași nesaturați (Solomon et al. - citați de Verma et al., 2011) [110].

În legătură cu proteinele umane țintite a fi obținute în experiențele de transgeneză la animale:

- șoarecii sunt manipulați genetic pentru - producerea de anticorpi monoclonali, antitrombină III, beta-interferon, proteina CFTR, serumalbumină umană (SAU), activatorul plasminogen tisular(tPA), prolactină, fibrinogen etc;
- puii și ouăle de găini pentru - producerea de vaccinuri, insulină, SAU;
- porcii, pentru organe de transplant la om, dar și pentru producerea de hemoglobină umană, proteina C umană;
- vacile pentru - factorii VIII și IX sanguini, proteina C, antitrombina III, SAU, proteina umană din lapte (lactoferina);
- iepurii pentru - proteina inhibitor C1 umană, hormonul de creștere uman, tPA, α -antitripsina umană, α -glucozidază, interleukina 2 umană;
- oile pentru - fibrinogen, factorii sangvini VIII și IX, proteina C activată, α -1-antitripsină etc (Bagle et al., 2012) [5].

Prin manipulările genetice la animalele de fermă se urmărește și creșterea calității unor produși animalii. De exemplu, au fost obținuți porci transgenici care exprimă niveluri ridicate de acizi grași omega-3, prin transferul de la spanac a genei pentru Δ 12-desaturază (Ormandy et al., 2011) [75].

Primul animal de fermă transgenic a fost realizat în 1991, o capră ce producea în lapte tPA [148], apoi în 1985 s-a obținut oaia "Tracy", care exprima în lapte niveluri ridicate de α -1-antitripsină (o proteină care, atunci când lipsește

la om, produce o formă rară de emfizem). Prima vacă transgenică ”Rosie”, a fost obținută în 1997 și producea în lapte 2,4 g/l α -lactoalbumină umană [23, 149].

Specialiștii în transgeneză au vizat laptele mamiferelor transgenice, ca fluid biologic în care să se acumuleze unele proteine umane, deoarece laptele este lipsit de proteaze și este secretat într-un compartiment oarecum separat al organismului. Astfel, oi și capre transgenice produc în laptele lor factorul sanguin de coagulare IX, antitrombina III, α -1-antitripsina și tPA (Bagle et al., 2012) [5]; porci transgenici ”fabrică” hemoglobină umană; vaci transgenice produc în laptele lor lactoferină (lapte util pentru mamele care dintr-un motiv sau altul nu pot alăpta sugarii) etc. Hrănirea iezilor (de capre) și a purceilor cu lapte pasteurizat provenit de la o capră transgenică, ce producea în laptele ei lizozim uman, a arătat că acest lapte era capabil să regleze microflora intestinală la cele două modele de animale (Maga et al., 2006) [62].

Când sursa de proteine terapeutice recombinant o reprezintă laptele produs de animalele transgenice, trebuie luate în calcul și alte elemente: timpul scurs până în momentul lactației sau costurile de întreținere a acestor animale. Pentru atingerea momentului lactației sunt necesare 12 luni la porci, 14 luni la oi și capre și 26 luni la vaci, iar durata lactației este de 2 luni la porci, de 6 luni la oi și capre și de 10 luni la vaci. Un dezavantaj al folosirii animalelor transgenice în acest scop îl reprezintă durata de timp necesară până la atingerea nivelului de producție (care înseamnă 3,5 luni la șoareci, 15 luni la porci, 28 luni la oi și 32 luni la vaci), iar cheltuielile de întreținere în condiții optime a unei vaci este estimat la 10.000 dolari/an (informații sintetizate de Demain și Vaishnav, 2009) [17]. Prezentăm în tabelul 6 unele date comparative legate de gestație, maturare, lactație etc, la unele mamifere transgenice utilizate în producerea de proteine recombinant de interes medical.

Tabel nr. 6 - Comparații între diferite specii de mamifere transgenice privind sistemul de expresie ”lapte” (după Wang et al., 2013)

Specia	Gestația (luni)	Maturare (luni)	Cantitatea de lapte/lactație (L)	Luni scurse de la microinjectare la lapte
Șoarece	0,75	1	0,0015	3-6
Iepure	1	5-6	1-1,5	7-8
Porc	4	7-8	200-400	15-16
Oaie	5	6-8	200-400	16-18
Capră	5	6-8	600-800	16-18
Vacă	9	15	6000-8000	30-33

Funcție de cantitatea necesară dintr-un produs anume se poate opta pentru unul sau altul din mamiferele transgenice de mai sus. Așa de exemplu, dacă sunt

necesare tone dintr-o proteină recombinant (cum ar fi albumina) se va opta pentru obținerea proteinei respective în laptele de vaci transgenice, dacă sunt necesare cantități de ordinul sutelor de kg opțiunea poate fi laptele caprelor și oilor transgenice, iar dacă sunt necesare cantități de ordinul kilogramelor atunci soluția pare să fie iepurii transgenici (Fan și Watanabe, 2003 – citați de Wang et al., 2013) [113].

Ținând cont de nivelurile de expresie ale acestora, de volumul zilnic de lapte și de eficiența proceselor de purificare, unii autori au estimat numărul necesar de animale pentru obținerea cantităților solicitate pe piață pentru unele proteine recombinant. Astfel, pentru obținerea unei cantități de 100 tone de serum albumină umană (solicitată anual în lume) ar fi necesare 5400 de vaci transgenice; pentru a produce 5 tone de α -antitripsină - 4500 de oi; pentru 100 kg de anticorpi monoclonali - 100 de capre; pentru 75 kg antitrombină III – 75 de capre; iar pentru a produce 2 kg de factor IX de coagulare uman doar 2 porci (Bösze și Hiripi, 2012 – citați de Wang et al., 2013). Numărul estimat de animale transgenice necesar pentru acoperirea nevoilor anuale ale unor proteine recombinant terapeutice pare ridicol de mic, în raport cu performanța, dacă lucrurile ar fi atât de simple pe cât rezultă din calculele teoretice. Chiar dacă în prezent astfel de calcule și cifre avansate par de domeniul science-fiction, cu siguranță nu va trece multă vreme până ele vor deveni realitate. Rezultatele deja obținute sunt cât se poate de promițătoare.

Sunt și evaluări privind costurile de producție în cazul folosirii culturilor de celule și animalelor transgenice pentru obținerea de proteine terapeutice, din care rezultă că, în cazul producerii a 50 kg proteină/an costurile s-ar ridica la 147 dolari/g produs în culturi celulare și respectiv 20 \$/g prin intermediul animalelor transgenice, iar la un necesar de 100 kg proteine/an, costurile ar diminua semnificativ și ar fi de 48 și respectiv 6 \$/g produs (Dyck et al., 2003 – citați de Wang et al., 2013) [113].

Având în vedere cantitățile mici necesare pentru unele proteine recombinant terapeutice, aspectele economice și de igienă, o serie de cercetători și-au îndreptat atenția spre iepuri ca posibile "bioreactoare" transgenice de producere a acestora în laptele lor. Argumentele pentru această alegere: talia redusă a animalelor, potențialul reproductiv ridicat, timpul scurt de gestație, întreținere mai puțin costisitoare, conținutul ridicat de proteine în lapte (de 2,5 ori mai mare ca în laptele de oaie și de 4,8 ori mai mare ca în laptele de capră), cantitatea de până la 10 kg lapte/an/femelă în lactație, nivelul de cca 20 g/L proteine în lapte etc. De aici și concluzia lui Wang et al. (2013) că "nu

întotdeauna ceea ce e mai mare e și mai bun”, ceea ce ar însemna că pentru producerea unor proteine terapeutice recombinant ne putem orienta spre iepuri și nu spre vaci transgenice, de exemplu. Iepurii transgenici s-au dovedit atractivi pentru expresia în glandele mamare a unor hormoni, peptide bioactive, proteine terapeutice. Gama proteinelor umane produse de către iepurii transgenici include: α -antitripsina, interleukina-2, activatorul plasminogen tisular, eritropoietina, hormonul de creștere, α -glucozidaza, factorul de creștere a nervilor, factorul VIII de coagulare, lactoferina, inhibitorul C1, proteina C etc, (tab.7) [113].

Tabel nr.7 – Proteine recombinant produse de iepuri transgenici
(după Wang et al., 2013)

Proteina	Promotorul	Nivelul proteinei exprimate	Referințe
α 1-antitripsina umană	ADN α 1-antitripsina umană	1 g/L în plasmă	Massoud et al., 1991
α -glucozidaza umană	α s1-cazeina bovină N-acetil- β -glucozaminil	8 g/L ND	Bijvoet et al., 1999 Jongen et al., 2007
Inhibitorul C1 uman	ND	ND	Koles et al., 2004
Factorul VIII uman de coagulare	PAZ șoarece PAZ șoarece PAZ iepure PAZ iepure	ND 0,005-0161 g/L 0,0000003 g/L ND	Hiripi et al., 2003 Chrenek et al., 2007 Rodriguez et al., 1995 Massoud et al., 1996
Eritropoietina umană	β -lactoglobulina bovină PAZ iepure PAZ iepure	0,5 g/L ND 60-178 UI/L	Korhonen et al., 1997 Aguirre et al., 1998 Mikus et al., 2004
SOD extracelulară umană	PAZ șoarece PAZ șoarece	3 g/L 0,000012 g/L	Strömqvist et al., 1997 Limonta et al., 1995
Hormonul de creștere uman	PAZ șobolan PAZ șobolan	0,5-1,0 g/L 0,010 g/L	Lipinski et al., 2003 Lipinski et al., 2012
Interleukina-2 umană	β -cazeina de iepure α s1-cazeină bovină	0,0005 g/L 1 g/L	Buhler et al., 1990 Brem et al., 1994
Factorul de creștere uman insulin-like	α s1-cazeină bovină α s1-cazeină bovină	0,3 g/L 0,678 g/L	Wolf et al, 1997 Zinovieva et al., 1998
Factorul β de creștere a nervilor la om	α s1-cazeină bovină Adenoviral	0,25 g/L 0,346 g/L	Coulibaly et al., 1999 Xiao et al., 2008
Activatorul plasminogen tisular (tPA) uman	α s1-cazeină bovină	0,00005 g/L	Riego et al., 1993
Chimozinul bovin	α s1-cazeină bovină	1,5 g/L	Brem et al., 1995
Hormonul de stimulare foliculară bovin	α s1-cazeină bovină	0,1 g/L	Coulibaly et al., 2002
Gonadotropina corionică ecvină	PAZ iepure	0,022 g/L	Galet et al., 2001
Calcitonina de somon	β -lactoglobulina ovină	2,1 g/L	McKee et al., 1998
Proteina C umană	PAZ șoarece	0,0000001-0,0000003 g/L	Dragin et al., 2005
Fosfataza alcalină nespecifică de țesut	PAZ umană	ND	Bodrogi et al., 2006
Lactoferina umană	Adenoviral	2,3 g/L	Han et al., 2008
Interferon beta uman	ND	2,2-7,2 x 10 ⁷ IU/L	Khodarovich et al., 2008
Antitrombina umană	Adenoviral	4,8 g/L	Yang et al., 2012

ND – ne-disponibil; SOD – superoxid-dismutază; PAZ – proteina acidă din zer

Într-o sinteză dedicată producerii de proteine recombinant de către diverse organisme transgenice și sisteme celulare de expresie, citând diverși autori, Demain și Vaishnav (2009) arătau că s-au obținut oi transgenice ce produc lapte cu un conținut de 35 g/L α -1-antitripsină umană (glicoproteină serică anti-emfizem) sau 5 g/L fibrinogen recombinant, capre transgenice având 3 g/L tPA, sau 14 g/L anti-trombină III în lapte, porci transgenici care produc în lapte 1 g/L/h proteină C umană (un anticoagulant) sau 40 g/L hemoglobină umană, vaci transgenice cu 35 g/L proteină în lapte, iepuri transgenici cu 8 g/L α -glucozidază, șoareci transgenici cu un titru de 4 g/L hormon de creștere uman și 2 g/L anti-trombină în lapte etc [17].

În afară de lapte, ca fluid în care să se acumuleze proteinele recombinant umane, cercetătorii vizează teoretic și alte sisteme, precum sângele, plasma seminală, urina, glandele sericigene, hemolimfa larvelor de insecte etc, deși deocamdată, doar laptele s-a dovedit un "mediu" propice. Hormonul de creștere uman a fost produs în urina șoarecilor transgenici la un titru mult mai scăzut (ca în lapte) de 0,1-0,5 mg/L (Kerr et al., 1998 – citați de Demain și Vaishnav, 2009) [17]. Prin folosirea unor secvențe de reglare specifice de țesut este posibilă exprimarea genei țintite în aproape orice țesut. Un astfel de țesut poate fi chiar sângele. O construcție de fuziune de acest gen, realizată între promotorul β -globulinei de porc și regiunea ce codifică β -globulina umană, a asigurat exprimarea în sângele de porc de până la 24% hemoglobină A umană, proteină care s-a dovedit echivalentă cu cea umană purificată. Din păcate, compoziția chimică complexă a sângelui face dificilă izolarea și purificarea proteinei recombinant din sângele de porc, iar folosirea sângelui ca fluid de acumulare a proteinelor recombinant (care trebuie recoltat și prelucrat) ridică probleme de sănătate și pentru animalul transgenic, (Mahmoud, 2007) [63].

În 2006, Administrația americană pentru alimente și medicamente (USFDA) a aprobat prima proteină umană recombinant *ATryn*, un anticoagulant produs (de CTC Biotherapeutics) în laptele de capră transgenică, pentru tratarea bolnavilor cu deficiența ereditară antitrombinică [5, 75, 148]. Se află în diverse faze de încercare și alte proteine recombinant produse prin transgeneza animală, de perspectivă în tratamentul unor boli umane: esteraza C1 inhibitor - care inhibă sistemul complement, α -glucozidaza pentru tratarea deficienței în maltază acidă (boala Pompe), α -antitripsina pentru fibroza chistică, tPA pentru cheagurile coronariene, un vaccin pentru boala Alzheimer etc.

Este necesară totodată patentarea de modele animale pentru diferite boli umane în vederea înțelegerii mecanismului acestor boli, testarea de noi molecule

pentru tratarea acestor boli, verificarea eficienței acestora, a potențialului lor terapeutic și a profilului toxicologic etc, înaintea încercărilor clinice. Pentru descoperirea de noi medicamente și încercarea lor pe om, se impun cercetări preclinice pe aceste modele animale (Bagle te al., 2013) [5]. Există modele de șoarece pentru cca 100 de gene umane mutant, care produc o serie de boli întocmai ca la om: câteva tipuri de cancer, boli ale inimii, tulburări metabolice și hormonale, diabet, obezitate, osteoporoză, boli de pigmentare a pielii, tulburări neurodegenerative, deficiențe la naștere (despicături palatine, anencefalie) etc (Rosenthal și Brown – 2007, citați de Simmons, 2008) [95], care asigură atât studierea aprofundată și înțelegerea mecanismelor acestor boli, cât și identificarea (în testări preclinice) a unor medicamente pentru tratarea lor.

Printre animalele transgenice model pentru studiul unor boli umane figurează și unele primat. În această situație se află *Macaca mulatta*, ca model pentru studiul bolii Huntington (Yang et al., 2008 - citați de Simmons, 2008) [95], sau *Callitrix jacchus* pentru studiul bolii Parkinson [133]. Un model animal, precum cel din urmă, a fost obținut de Școala medicală din Harvard în 2000 și la musculița de oțet. Această *drosofilă Parkinson* poartă în genomul ei o genă mutant pentru *α-sinucleină*, musculița manifestând pierderi de control al mișcării și a neuronilor dopaminici, observate și în cazul oamenilor ce suferă de această boală [148].

Au fost manipulate unele organisme (inclusiv mamifere), pentru proteina fluorescentă verde - GFP (gena *gfp* provine de la meduza *Aequorea victoria* și poate fi linkată și să se co-exprime cu gene de la mamifere și astfel să se identifice poziția (locul) acestora pe cromosomi. Descoperirea ei a adus în 2008 premiul Nobel cercetătorilor Martin Chalfie (primul care a marcat cu GFP, în 1994, celulele de *Caenorhabditis elegans*), Osamu Shimomura (cel care a izolat prima dată GFP, în 1962) și Roger Tsien (care, în 1998, a descoperit mecanismul fluorescenței și a creat variante de culoare GFP și fluorescență mai puternică).

În mai multe țări, după 2000, s-au crescut porci GFP pentru studiul posibilităților de transplant de organe la om, pentru regenerarea celulelor fotoreceptor oculare, a celulelor neuronale din creier, pentru medicina regenerativă via celule stem, pentru studiul unor boli etc. Au fost obținuți porci GFP în SUA (în 2000), în Coreea (în 2002), în Taiwan (în 2006), în China (în 2008) și în Japonia (în 2009), [149]. În 2011 s-au obținut și pisici GFP pentru a identifica tratamente împotriva HIV (SIDA) și altor boli, virusul imunodeficienței feline (FIV) fiind înrudit cu HIV.

Prin transferul genei pentru enzima *fitază* la porci (prin microinjectare pronucleară) s-au obținut porci (*Enviro-pig*) capabili să digere hrana bogată în fosfor (pot degrada fitații din hrană), porci ce elimină cu 30-70% mai puțin fosfor (element poluant) în bălegar [75, 133], ceea ce contribuie la reducerea poluării cu fosfor în agricultură.

Operațiuni de transgeneză s-au realizat și la pești. S-au obținut somoni care produc hormoni de creștere tot anul și nu în dependență de sezon, sau care au primit gena pentru o proteină antigel de la cambulă (care sunt mai rezistenți la frig), sau crapți transgenici pentru gena hormonului de creștere de la păstrăvul curcubeu. S-a obținut un somon transgenic care, spre deosebire de cel obișnuit, produce continuu hormon de creștere și nu numai funcție de sezon, sau păstrăv căruia i s-a transferat gena hormonului de creștere de la somon [148]. Unele specii de pești, cum sunt peștele zebură și medaka sunt frecvent manipulate genetic întrucât posedă corion optic clar, se dezvoltă rapid, iar embrionul unicelular poate fi ușor observat și microinjectat cu ADN străin [149]. O realizare interesantă de acest gen este "*GloFish*" (peștele zebură, *Danio rerio*), modificat genetic prin inserția genei GFP – (folosit ca senzor ecologic - își schimbă culoarea în prezența poluanților), [133, 149]. *GloFish* a început să fie comercializat în SUA în 2003 ca pește ornamental (Ormandy et al., 2011) [75, 149], fiind singurul animal transgenic aprobat de USFDA pentru a fi "utilizat" de către om; există variante ale genei *gfp* și de aceea și culorile acestui pește pot varia de la galben fluorescent, la roșu fluorescent, [82, 108].

Pentru obținerea unor animale utile omului în afara inserției de gene străine, s-au folosit și tehnicile KO. Spre exemplu, pentru obținerea ca animale de companie a unor pisici hipoalergenice, s-a blocat gena ce codifică proteina *Feld1*, un alergen major (Ormandy et al., 2011) [75]. S-au produs de asemenea viermi de mătase transgenici, care produc în coconii lor procologen uman de tipul III (Tomita et al., 2002) [105].

Chiar și țânțarii reprezintă obiectul unor operații de inginerie genetică. Prin inginerie genetică au fost obținuți țânțari "rezistenți la malarie", sau țânțari masculi din specia *Aedes aegypti* (purători ai virusului *febrei Dengue*), cărora li s-a inserat o genă letală cu scopul reducerii populației de țânțari. În experiențe efectuate în 2010 cu acești țânțari transgenici în Insulele Cayman, populația de țânțari de aici a fost redusă cu 80%), [133]. Deși s-au obținut progrese însemnate în transgeneza animalelor, cum am consemnat deja, procesul de inginerie genetică la animale este lent, dificil și costisitor. Până în septembrie 2013, nici un produs animal MG nu fusese aprobat pentru comercializare.

Deși nu ne-am propus să abordăm aportul ingineriei genetice în corectarea sau tratarea unor boli la om, vom spune totuși unele lucruri și despre acest subiect. Nu au fost încă depășite temerile și dificultățile tehnice de operare la nivel genetic *in vivo* la om, deși unele teste clinice nu lipsesc. Prima încercare de terapie genică la om aparține dr. S. Rosenberg (citată de O'Conor și Hulbert, 2012) [73], care în 1989 a demonstrat posibilitatea de transfer al genelor cu ajutorul retrovirusurilor la cinci pacienți cu melanom.

După 1989 s-au făcut cca 1000 de încercări de terapie genică la om în 24 de țări (majoritatea în SUA), iar pentru transferul genelor sănătoase în celulele bolnave s-au folosit în special vectori virali. S-au efectuat teste în cazul multor boli, dar mai ales în cancer [73.] Terapia genică pare să fie o variantă de abordare a unor boli umane la care nu există alte opțiuni de tratament, în special pentru boli monogenice și mai puțin pentru boli complexe. Transgeneza își poate găsi aplicații într-un șir de boli umane precum cele cardiovasculare, oculare, lisosomale, Parkinson, osteoartrită etc (Khan, 2010) [48].

Una din bolile genetice asupra cărora și-au îndreptat specialiștii atenția, pentru a o corecta genetic, este *mucoviscidoza* sau *fibroza chistică*, boală monogenică ce afectează cca 1/2500 din nou-născuți în populațiile umane din Caucaz. Cauza bolii este mutația genei CFTR (regulatorul fibrozei chistice trans-membranare), genă situată pe brațul lung al cromosomului 7 la om. Proteina codificată de gena CFTR numără 1480 de aminoacizi, iar în majoritatea cazurilor de boală, o mutație a genei (o deleție), determină lipsa aminoacidului fenilalanină din poziția 508 a proteinei (O'Conor și Hulbert, 2012) [73].

Boala constă în inflamarea progresivă a căilor bronho-pulmonare, fapt ce duce la insuficiență respiratorie severă și la moartea indivizilor afectați, într-un procent ridicat, până la vârsta de 30 de ani. Se produc diferențe exagerate de potențial electric de o parte și de alta a membranei celulelor din epiteliile respiratorii, fapt ce antrenează tulburări în schimbul de apă și ioni (Cl^- și Na^+) între celule și mediul intern [7, 33].

Vectorii considerați de perspectivă pentru transferul genei CFTR normale în celulele epiteliale bolnave par a fi retrovirusurile, adenovirusurile și lipozomii. În experiențe *in vitro* pe celule epiteliale bolnave s-a observat că transferul genei CFTR a condus la eliminarea tulburărilor în diferențele de potențial electric și de transport al ionilor. În încercări *in vivo* de transfer al genei CFTR (cu ajutorul adenovirusurilor), în celulele pulmonare la șoarece, s-a constatat că proteina CFTR a fost sintetizată câteva săptămâni de către celulele epiteliului respirator [7]. Potrivit informațiilor lui O'Conor și Hulbert (2012)

[73], astfel de încercări *in vivo* s-ar fi efectuat și la om. Citându-l pe Knowles (1995), autorii menționați anterior arată că în 1995 au fost supuși unor teste clinice 12 pacienți cu fibroză chistică, prin transferul genei cu ajutorul vectorilor adenovirali în epiteliul nazal al acestor subiecți, dar transferul s-a dovedit ineficient. Încercări de acest gen s-au efectuat și la Universitatea Stanford, gena fiind transferată pacienților prin intermediul virusurilor adeno-asociate, via aerosoli; când virusurile s-au inserat în epiteliul nazal s-a înregistrat o reducere semnificativă a inflamației acestuia, dar nu s-a reușit transferul genei în celulele epiteliului pulmonar (Tane, 1999 - citat de O’Conor și Hulbert, 2012) [73]. De viitor în transferul genei CFTR par a fi vectorii adenovirali. Folosirea în astfel de încercări a unor adenovirusuri perfecționate în acțiuni de acest fel a crescut durata efectelor pozitive la șoarece până la 15 săptămâni (Mueller și Terence, 2008 – citați de aceiași autori).

Se poate aprecia că, deși s-au înregistrat unele progrese în domeniul terapiei genice *in vivo* la om, nu s-a făcut încă pasul decisiv, și asta din cauza dificultăților tehnice și a riscurilor acestei tehnologii. Trebuie să rămânem însă optimiști pentru că, în cazul unor boli cum ar fi cancerul, bolile neuro-degenerative, unele boli cardio-vasculare (hipercolesterolemie familială, ateroscleroză), boli cronice (poliartrita reumatoidă) etc, riscurile pentru sănătate sunt la fel de mari, poate chiar mai importante decât cele presupuse de ingineria genetică. Asta înseamnă că, într-o bună zi, societatea umană va fi dispusă să accepte unele riscuri pe care le incumbă terapia genică la om, atunci când e vorba de boli severe. În terapia cancerului, așa cum arătam într-o lucrare anterioară (Ghiorghiță și Petrescu-Nicuță, 2005) [33], sunt explorate tehnici *ex vivo* de terapie genică, ce urmăresc: stimularea sistemului imunitar în lupta cu celulele tumorale; blocarea oncogenelor și activarea antioncogenelor; sensibilizarea celulelor tumorale la unele toxine (otrăvirea tumorilor prin transferul în tumori a unor gene ”sinucigăse”) etc.

3.2.1. Sisteme celulare animale folosite în producerea de proteine recombinant

Pentru unele proteine recombinant terapeutice (cum ar fi hormonii, factorii sanguini, anticorpii monoclonali), la care glicozilarea influențează unele caracteristici ale lor precum stabilitatea, imunogenitatea, durata de viață în ser și chiar eficacitatea acestora, se utilizează ca sisteme de expresie: celule de mamifere (CHO - linii celulare ovariene de hamster chinezesc), celule de drojdii, linii celulare de insecte, de plante și chiar linii celulare umane. Dintre

acestea, cele mai folosite sunt sistemele de producere bazate pe celule de mamifere (în special linia CHO), 32 din cele 58 de biomolecule terapeutice aprobate în perioada 2006-2010 fiind produse de către aceste sisteme (Walsh, 2010 – citat de Kim et al., 2012) [49]. Există o diferență majoră între vectorii folosiți în obținerea unui animal transgenic și cei utilizați în transfecția liniilor celulare animale. În primul caz (la mamifere), nu sunt mijloace de a afla soarta transgenei după integrarea ei în genomul gazdă și nu este posibilă depistarea (selectarea) embrionilor transgenici înainte de a fi implantați în uterul animalului receptor. În cazul liniilor celulare însă, se poate include în vectorul de transfer o genă de rezistență la un drog, și pe baza acestui marker pot fi selectate celulele modificate genetic, (Mahmoud, 2007) [63].

Ca sistem de expresie a proteinelor recombinant, celulele de insecte se află între sistemele bacteriene și cele de mamifere:

- peptidele semnal sunt clivate ca în în celulele de mamifere. Punțile disulfidice se formează în reticulul endoplasmatic;
- pentru procesarea proteolitică sunt disponibile enzimele de convertire a pro-proteinelor;
- liniile celulare de insecte cresc la densități mai mari decât cele de mamifere;
- sunt mai puțin pretențioase în privința condițiilor de cultivare;
- nu necesită creșterea nivelului de biosiguranță dacă transgena este inserată cu ajutorul baculovirusurilor;
- dacă proteina recombinant provine de la insecte atunci nu sunt necesare modificări post-tranlaționale (ca în cazul bacteriilor) etc, (Kollewe și Vilcinskas, 2013) [50].

În cazul celulelor de insecte glicozilarea nu este identică cu cea specifică celulelor de mamifere, modelul de glicozilare fiind o însușire critică a unei proteine, de acest model depinzând comportarea ei. Cele mai folosite linii celulare de insecte în producerea de proteine recombinant sunt celulele Schneider 2 (S2) provenite din stadiile embrionare târzii ale insectei *Drosophila melanogaster* și celulele Sf-9 provenite din țesutul ovarian pupal al fluturului *Spodoptera frugiperda*.

Cei mai utilizați vectori pentru expresia proteinelor recombinant în celulele de insecte sunt baculovirusurile (BEVS – *baculovirus expression vector system*), în special NPV (*nuclear polyhedrosis virus*), care infectează insectele (mai ales fluturii și moliile). În prezent pot fi manipulați pentru a exprima gene străine și a genera linii celulare baculovirusuri ale polihidrozei nucleare de la

Autographa californica (AcNPV), de la *Bombyx mori* (BmNPV), sau de la *Limantria dispar* (LdNPV). Expresia proteinelor heteroloage poate fi realizată în culturi celulare de insecte la scară mică (flacoane de 100 ml, agitate), la nivel de bioreactor (de 100 L), sau poate avea ca sursă larvele insectelor transgenice (după Mahmoud, 2007) [63].

Potrivit informațiilor sintetizate de către Demain și Vaishnav (2009) [17], sistemul de expresie a proteinelor recombinant bazat pe celule de insecte, având ca vector baculovirusul (BEVS), este superior sistemului drojdiilor și are o serie de avantaje și dezavantaje. În lucrările de profil, precizează autorul, sunt menționate următoarele avantaje ale acestui sistem:

- este un sistem capabil de modificări post-tranlaționale de tip eucariot, ce includ fosforilarea, N- și O-glicozilarea, clivajul corect și eficient al peptidului semnal, procesarea proteolitică proprie, acilarea, palmitilarea, amidarea, carboxi-metilarea etc;
- are capacitatea de împachetare proprie a proteinelor și de formare a punților disulfidice;
- prezintă niveluri înalte de expresie a proteinelor, genele clonate fiind plasate sub controlul genei promotor pentru polihedrină (care se exprimă în mod normal la nivel ridicat în celule). Sistemul producea cca 600 mg/L proteină în 1988 și cca 11 g/L proteină în 2007, ceea ce denotă progresele semnificative înregistrate între timp în perfecționarea acestui sistem de expresie;
- celulele se pot cultiva în suspensie la densități mari, pe scară mare;
- prezintă siguranță, baculovirusii infectând doar insectele;
- nu există limite în privința dimensiunilor proteinelor;
- pot fi exprimate simultan mai multe gene.

Printre dezavantajele acestui sistem de expresie a proteinelor recombinant sunt enumerate:

- modelele de procesare post-tranlațională a proteinelor trebuie determinate pentru fiecare caz în parte;
- există diferențe între proteinele produse în acest sistem și cele produse în celulele de mamifere (în primul caz, de exemplu, secreția este inefficientă);
- împachetarea improprie a proteinelor în unele cazuri, precum și formarea uneori a agregatelor proteice intracelulare;
- niveluri scăzute de expresie (care pot fi optimizate prin timpul de expresie și infecția multiplă);
- glicozilare incorectă în unele situații.

Totodată, sistemul de producere a proteinelor recombinant în celulele de insecte nu este atât de simplu precum sistemul drojdiilor, este lent și consumator de timp (după Demain și Vaishnav, 2009)[17].

Încă în 1988, Maiorella et al., raportau obținerea în acest sistem de expresie a factorului de stimulare a coloniilor de macrofage (M-CSF), la un titru de 40 mg/L [64]. De altfel, citând o serie de autori, Alireza et al. (2011) arătau că folosirea acestui sistem a asigurat expresia unor proteine străine la niveluri de 1-500 mg/L. Autorii raportau un nivel de 100 μg/ml a factorului de coagulare FVII, obținut de ei în sistemul de expresie celule BTI-TN-5B1-4, după 72 de ore de la infecția cu baculovirus [2].

Sistemul permite coexpresia genelor heteroloage și obținerea de complexe multi-proteice sau a proteinelor specializate (chaperon). Acest sistem este privit de perspectivă și în producerea de vaccinuri recombinant, dar și în utilizarea baculovirusurilor ca vectori în terapia genică (după Kollewe și Vilcinkas, 2013) [50]. De altfel, Weber și Fussenegger (2009) arătau că aprobarea în 2007 în Europa a vaccinului *Cervarix* (pentru cancer cervical), produs de compania Glaxo Smith Kline, și dezvoltarea altor vaccinuri precum *FluBlok* (pentru influența), produs de către Protein Sciences Inc., arătau interesul în creșterea pentru obținerea de proteine terapeutice recombinant folosind sistemul de expresie a celulelor de insecte infectate de baculovirus (BEVS) [114].

Companiile biotehnologice care folosesc celulele de mamifere ca sistem de producere a proteinelor recombinant se bazează fie pe tehnologia de amplificare cu metotrexat (MTX), fie pe glutamin sintetază (GS), în ambele sisteme clonele obținute fiind heterogene, ca urmare a integrării întâmplătoare a transgenei în genom. Este motivul pentru care se impune sortarea unui număr mare de clone pentru izolarea unora cu capacitate înaltă de expresie și manifestare stabilă, proces care impune o muncă intensă, ce poate dura 6-12 luni (Lai et al., 2013) [53].

Există diverse linii celulare de mamifere utilizate în acest scop, cum ar fi celulele ovariene de hamster chinezesc (CHO), celulele renale de pui de hamster (BHK), celulele derivate din mielom de șoarece (NSO), celulele renale de maimuță verde, liniile celulare umane HEK-293, PER-C6, HKB11, CAP, HT1080. Celulele CHO au fost obținute în 1957 și provin din ovarul unui adult de hamster chinezesc (*Cricetulus griseus*), iar celulele BHK sau BHK21 au fost obținute în 1961 și provin din rinichiul de hamster sirian (*Mesocricetus auratus*) în vârstă de 1 zi, (Mahmoud, 2007) [63]. Cele mai folosite dintre toate aceste sisteme sunt celulele CHO, BHK, NSO și SP2/0 (hibridoma), pentru că posedă

mașinăria de bază pentru expresia și secreția proteinelor recombinant glicozilate (Swiech et al., 2012) [102]. Folosind sistemul celulelor NSO, de exemplu, s-a raportat producerea de anticorpi monoclonali la un titru de 2,5 g/L (Zhang și Robinson, 2005 - citați de Demain și Vaishnav, 2009) [17].

Cel mai bine pus la punct și utilizat sistem de producție dintre cele enumerate îl reprezintă celulele CHO, prin intermediul cărora s-au obținut cca 70% din proteinele terapeutice recombinant (Jayapal et al., 2007) [45]. Se pare că cifra avansată mai sus este exagerată, pentru că există informații mai credibile, după părerea noastră, potrivit cărora cca 39% din proteinele recombinant sunt produse de *E. coli*, doar 35% de către celulele CHO, 15% de către drojdii, 10% de către sisteme de mamifere și 1% de către alte bacterii și alte sisteme (Rader, 2008 – citat de Demain și Vaishnav, 2009) [17].

Sistemul CHO a fost și rămâne unul eficient și frecvent folosit de către firmele biotehnologice datorită unor particularități specifice:

- s-a constatat că este un sistem sigur și permite obținerea mai facilă a aprobării de către agențiile de profil a comercializării proteinelor terapeutice obținute de companiile biotehnologice;
- deși productivitatea celulelor CHO este mai scăzută, ea poate fi intensificată prin sisteme de amplificare genică (MTX și MSX), asigurând recolte mai mari de proteine recombinant (cantități de cca 100 ori mai mari per litru decât în anii 1980). La acest rezultat au contribuit și progresele realizate nu doar în selecția unor clone celulare înalt producătoare, ci și în optimizarea condițiilor de cultivare;
- celulele CHO au capacitatea de modificare post-translațională a proteinelor recombinant, producând glico-forme bioactive ale acestora, de tip uman, cu absența epitopului imunogenic α -galactoză;
- celulele CHO se pot adapta la cultivarea în suspensie pe scară largă, în medii de cultură lipsite de ser (serum-free). Există bioreactoare de peste 10.000 litri, în care suspensii celulare de hamster chinezesc produc anticorpi recombinant;
- celulele CHO posedă riscuri mici ca unele virusuri umane să se propage în ele (Kim et al., 2012; Lai et al., 2013) [49, 53].

Există două sisteme de amplificare genică folosite în creșterea capacității de sinteză a proteinelor recombinant de către celulele CHO. Unul dintre ele este sistemul dihidrofolat reductază (DHFR) și se bazează pe rezistența la metotrexat (MTX) - în care MTX inhibă dihidrofolat-reductaza, și al doilea se bazează pe rezistența la metionin-sulfoximină (MSX) - în care MSX inhibă glutamin-

sintetaza (GS). Enzima DHFR catalizează trecerea de la folat la tetrahidrofolat. MTX (care este asemănător cu folatul) se leagă la DHFR și inhibă producerea de tetrahidrofolat. Transgena de interes este strâns linkată cu gena pentru DHFR. Celulele CHO sunt cultivate la niveluri tot mai ridicate de MTX, și în acest fel sunt selectate celulele care dețin copii numeroase ale genei DHFR care, implicit, au și un randament sporit în sinteza produsului țintit.

Sistemul MSX este unul asemănător ca și concept. Enzima GS catalizează formarea glutaminei din glutamat și amoniu. MSX se leagă la GS și împiedică sinteza de glutamină. În acest caz, pentru selecția de celule CHO înalt producătoare de produs țintit, celulele sunt cultivate în prezența unor niveluri tot mai ridicate de MSX (Camire, 2000; Mahmoud, 2007) [12, 63]. O productivitate ridicată în obținerea proteinei dorite se poate realiza și prin creșterea numărului de celule/volum mediu de cultură/zi.

Întrucât, din 2001 piața de bio-farmaceutice a crescut anual cu cca 35%, se consideră că și în viitorul previzibil celulele CHO vor avea un rol important în acoperirea pieței de profil cu proteine recombinant terapeutice (Jayapal et al., 2007; Kim et al., 2012) [45, 49], mai cu seamă că ele se produc în acest sistem la un cost de producție echivalent cu cel în care sunt folosite culturile microbiene (Omasa et al., 2010) [74].

Activatorul plasminogen tisular (rtPA, Activase) a fost prima proteină recombinant terapeutică produsă cu ajutorul sistemului CHO, aprobată pentru utilizare clinică în 1986. De atunci și până în 2011 au primit aprobare 96 de proteine terapeutice recombinant, produse în acest sistem de expresie, care aduc anual SUA venituri estimate la cca 113 miliarde dolari (după Lai et al., 2013) [53].

Iată câțiva dintre produșii aprobați de către FDA (SUA) în intervalul de timp 1987-2006, obținuți prin folosirea acestui sistem (tab. 8):

Tabel nr. 8 - Produși biologici obținuți prin folosirea celulelor CHO
(după Jayapal et al., 2007) [45]

Produsul	Tipul	Utilizare terapeutică	Producătorul	Anul aprobării
Vectibix	Anti-EGFR mAb	Cancer colorectal metastatic	Amgen	2006
Myozyme	α -glucozidază	Boala Pompe	Genzyme	2006
Aldurazyme	Laronidază	Mucopolizaharidoză I	Genzyme	2006
Orencia	Ig-CTLA4 de fuziune	Artrită reumatoidă	Bristol-Myers Squibb	2005
Naglazyme	N-acetilgalactozamin-sulfatază	Mucopolizaharidoză VI	BioMarin Pharmaceutical	2005
Luveris	Hormon de luteinizare	Infertilitate	Serono	2004
Avastin	Anti-VEGF mAb	Cancer colorectal metastatic și cancer de plămân	Genentech	2004

Advate	Factorul VIII (eng.)	Hemofilie A	Baxter	2003
Xolair	Anti-IgE mAb	Astm moderat/sever	Genentech	2003
Raptiva	Anti CD11a mAb	Psoriazis cronic	Genentech	2003
Fabrazyme	α -galactozidază	Boala Fabry	Genzyme	2003
Rebif	β - interferon	Scleroză multiplă recidivată	Serono	2002
Humira	Anti-TNF α mAb	Artrită reumatoidă	Abbott	2002
Aranesp	Eritropoietină (eng.)	Anemie	Amgen	2001
Campath	Anti-CD52 mAb	Leucemie limfocitară cronică	Genzyme, Bayer	2001
ReFacto	Factorul VIII	Hemofilie A	Wyeth	2000
Tenecteplase	Activatorul plasminogen tisular (eng.)	Infarct miocardic	Genentech	2000
Herceptin	Anti-HER2 mAb	Cancer de sân metastatic	Genentech	1998
Enbrel	Receptorul TNF α de fuziune	Artrită reumatoidă	Amgen, Wyeth	1998
BeneFix	Factorul IX	Hemofilie B	Wyeth	1997
Follistim/Gonal-F	Hormonul de stimulare foliculară	Infertilitate	Serono/NV Organon	1997
Rituxan	Anti-CD20 mAb	Limfom non-Hodgkin	Genentech, Biogen Idec	1997
Avonex	β - interferon	Scleroză multiplă recidivantă	Biogen Idec	1996
Cerezyme	β -glucocerebrozidază	Boala Gaucher	Genzyme	1994
Pulmozyme	Deoxiribonuclează I	Fiboză chistică	Genentech	1993
Epogen/Procrit	Eritropoietină	Anemie	Amgen/Ortho Biotech	1989
Activase	Activatorul plasminogen tisular	Infarct miocardic acut	Genentech	1987

Randamentul de producere a proteinelor recombinant cu ajutorul celulelor de mamifere a crescut de la 50 mg/L în 1986, la 4,7 g/L în 2004, în special prin îmbunătățirea condițiilor de creștere (Aldridge, 2006 – citat de Demain și Vaishnav, 2009) [17]. Piața produselor obținute prin folosirea celulelor CHO depășește anual 30 miliarde \$ SUA, acest sistem fiind considerat și pentru viitorul apropiat ca cel mai important în obținerea de proteine terapeutice (Jayapal et al., 2007) [45].

Arătam anterior că în producerea de proteine recombinant sunt utilizate și unele linii celulare umane, pentru că locul, numărul și structura N-glicanilor în molecula bioterapicelor glicozilate influențează recolta obținută, bioactivitatea, solubilitatea, stabilitatea față de proteoliză, imunogenitatea etc. Deși proteinele recombinant umane sunt produse frecvent cu ajutorul liniilor celulare murine, care pot genera N-glicani în mod similar ca la om, ele au totuși două inconveniente:

- gruparea antigenică carbohidrat (gal α 1-3Gal) încorporată în ele lipsește la N-glicanii umani naturali;
- proteinele produse de celulele murine au o compoziție diferită în acid sialic (conțin acidul sialic N-glicolilneuraminic, nespecific omului).

Prin urmare, omul a pierdut două structuri majore prezente la alte mamifere: capacitatea de a biosintetiza epitopul terminal alpha-Gal și acidul sialic Neu5Gc, care pot afecta atât imunogenitatea cât și eficacitatea glicoproteinelor terapeutice, (după Ghaderi et al., 2012; Swiech et al., 2012) [31, 102].

Dintre liniile celulare umane, linia HEK-293, derivată din celule renale de embrion uman transformate, este cea mai folosită, probabil și ca urmare a faptului că celulele cresc ușor în suspensie, pe medii lipsite de ser. Cu toate acestea, doar o proteină terapeutică recombinantă – *Xigris*, obținută în sistem de expresie HEK-293, a fost licențiată. Celulele HEK-293 sunt utilizate larg și în producerea de vectori virali.

Linia celulară PER-C6 provine din retinoblaste umane embrionare și a fost promovată pentru producerea în siguranță de vectori adenovirali umani recombinant, fiind apoi folosită și la obținerea de vaccinuri, pentru terapie genică și mai recent pentru producerea de proteine terapeutice. Se consideră că, prin însușirile ei, această linie celulară ar putea deveni o platformă de expresie în obținerea de anticorpi monoclonali. Până în prezent 14 produși obținuți în acest sistem de expresie se află în încercări clinice, fazele I/II (după Swiech et al., 2012) [102]. S-au raportat randamente de producere a anticorpilor monoclonali de 15 g/L și chiar de 26 g/L (CocoMartin și Harmses, 2008; Jarvis, 2008 – citați de Demain și Vaishnav, 2009).

Sistemul de expresie al celulelor CAP se bazează pe amniocite umane obținute prin amniocenteză din lichidul amniotic. Compania CEVEC, care a dezvoltat acest sistem, consideră că avantajele folosirii acestuia ar consta în: producerea de proteine umane modificate post-tranlațional, o activitate specifică ridicată, evitarea resturilor de carbohidrați non-umani imunogeni, sializare corectă, recoltă ridicată de proteine complexe și reducerea costurilor de prelucrare din aval, culturi în suspensie lipsite de ser. Acest sistem este încă la început și deocamdată nu există prea multe informații privind utilizarea lui în obținerea de proteine terapeutice recombinant. Din fuziunea cu ajutorul PEG a celulelor renale aparținând liniei 293S cu celule 2B8 (derivate din limfomul Burkitt) s-au izolat prin selecție unele clone hibride, între care HKB-11, clonă capabilă să producă niveluri ridicate de expresie a citokinelor, proteinelor ICAM-1 și factorului rFVIII.

Celulele HT-1080 sunt derivate din fibrosarcom și sunt folosite de compania Shire în producerea a patru proteine terapeutice și anume: Dynepo (epoetină delta), Elaprased (iduronat-2-sulfatază), Replagal (alfa-galactozidază A) și VPRIV (velaglucerază alfa). Epoetina delta produsă cu ajutorul celulelor HT-

1080 umane prezintă un profil carbohidrat de tip uman, fiind superioară din acest punct de vedere eritropoietinelor produse cu ajutorul celulelor CHO. În prezent, se fac eforturi pentru optimizarea liniilor celulare utilizate deja industrial în producerea de proteine terapeutice recombinant, dar și pentru producerea acestora cu ajutorul liniilor celulare umane, pentru a se asigura astfel obținerea *in vitro* de proteine umane cu profil de glicozilare identic celui *in vivo* (după Swiech et al., 2012) [102].

Specialiștii de la Amgen au izolat genele pentru unii factori de creștere hematopoietică (proteine hormon ce reglează producerea și maturarea unor celule sanguine) și anume pentru eritropoietină (care stimulează maturarea eritrocitelor în măduva oaselor) și factorul de stimulare a coloniei de granulocite și au produs proteinele recombinant Epogen (sau Epoetina alfa) și respectiv Neupogen (Filgrastim) [151].

În tabelul 9 prezentăm comparativ (după Dingermann, 2008) câteva dintre caracteristicile unor sisteme (platforme) de expresie a proteinelor terapeutice recombinant [20].

Sistemele de expresie bacteriene au, cum s-a arătat anterior, limite în producerea glicoproteinelor, pentru că le lipsesc mecanismele enzimatice și compartimentarea celulară specifice glicozilării de la mamifere. Cu toate acestea, bacteriile sunt folosite în obținerea unor proteine terapeutice (hormoni, enzime, anticorpi monoclonali, citokine), unele dintre acestea fiind modificate chimic prin legarea covalentă a lanțurilor PEG (polietilen glicol), acțiune care le prelungește durata de viață, le fac mai stabile și le reduce caracterul imunogen provocat de lipsa glicozilării (Ghaderi et al., 2012) [31].

Ca și bacteriile, drojdiile reprezintă platforme bine puse la punct pentru producerea de proteine terapeutice neglicozilate. Deși drojdiile au capacitatea de glicozilare, N-glicanii produși de ele sunt hipermanozilați, resturile suplimentare de manoză având un caracter înalt imunogen la om. Se fac eforturi pentru modificarea genetică a drojdiilor, astfel încât să devină capabile să producă glicoproteine de tip uman N-glicozilate.

Și celulele de insecte generează proteine recombinant cu structuri glican diferite de glicoproteinele umane, cum ar fi glicani la care predomină resturile 3-7 manoză, care conțin resturi α 1-3-fucoză imunogenă, lipsa glicanilor cu acizi sialici terminali, limite care se încearcă a fi depășite prin abordări de glico-inginerie.

De mecanisme de glicozilare a proteinelor dispun și plantele, care sunt însă diferite de ale omului. N-glicanii de origine vegetală prezintă resturi

Tabel nr. 9 - Caracteristici ale sistemelor de producție pentru proteine recombinant
(după Dingermann, 2008)

Sistem de expresie	Clasificare	Dezvoltarea sistemului	Legături disulfidice	Glicozilare	Secreție	Costuri fermentație	Utilizare antibiotice	Costuri de siguranță	Dezvoltare proces	Produs pe piață
<i>Escherichia coli</i>	Bacterie Gram-negativă	Complet dezvoltat	Da, în periplasmă	Nu	Secreție periplasm	Dependente de promotor slab/moderat	Tipic necesar	Costuri mici	Scară industrială	Da
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Drojdie ce înmugurește	Complet dezvoltat	Da	Da; multă manoză	Posibilă	Scăzute	Ne-necesară	Costuri mici	Scară industrială	Da
<i>Pichia pastoris</i>	Drojdie metilotrofă	Complet dezvoltat	Da	Da; fără manoză α -1,3 terminală	Posibilă	Scăzute	Ne-necesară	Costuri mici	Scară industrială	Da
<i>Hansenula polymorpha</i>	Drojdie metilotrofă	Complet dezvoltat	Da	Da; fără manoză α -1,3 terminală	Posibilă	Scăzute	Ne-necesară	Costuri mici	Scară industrială	Da
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Drojdie dimorfică	Stadiu timpuriu	Da	Da; trăsături exacte necunoscute	Posibilă	Scăzute	Ne-necesară	Costuri mici așteptate	Scară de laborator	Nu
Celule de plante	Eucariote superioare	Complet dezvoltat	Da	Da; fucoză terminală	Posibilă; restricții de mărime	Moderate	Ne-necesară	Costuri mici	Scară pilot; scară de producție	Da (Cuba)
Celule de mamifere	Eucariote superioare	Complet dezvoltat	Da	Da; de tip uman	Obișnuită	Ridicate	Ne-necesară	Costuri ridicate	Scară industrială	Da
Animale	Mamifere	Complet dezvoltat	Da	Da; de tip uman	Obișnuită	De fermă; costuri moderate	Ne-necesară	Costuri ridicate	Scară industrială	Da

α 1-6-fucoză specifice glicanilor umani. În încercări clinice se află totuși unele proteine recombinante cu structuri glican de tip vegetal, cum ar fi transferina umană și lizozimul uman. Și în cazul plantelor se fac eforturi ca, prin operațiuni de inginerie genetică, să fie echipate cu mașinăria de glicozilare specifică mamiferelor și omului, (Ghaderi et al., 2012) [31].

Deocamdată, doar mamiferele dispun de complexul de glicozilare de tip uman pentru a produce la scară industrială proteine recombinante terapeutice, iar medicamentele din această categorie, aprobate de USFDA, sunt direct purificate din plasma sau din laptele de mamifere, fie sunt produse de către unele linii celulare de mamifere (CHO, BHK, NSO, Sp 2/0) fie, în mai mică măsură, de linii celulare umane, după cum am precizat deja. În tabelul 10 sunt prezentate și alte proteine recombinante terapeutice (decât cele din tabelul 9) aprobate de către USFDA, obținute cu ajutorul mamiferelor.

Tabel nr. 10 - Glicoproteine terapeutice recombinante având ca sursă mamiferele, aprobate de FDA și probabilitatea contaminării lor cu Neu5Gc (după Ghaderi et al., 2012, modificat) [31]

Agentul (produsul)	Compania producătoare	Sursa (gazda)	Șansa pentru Neu5Gc
ANTICORPI MONOCLONALI			
Actemra , Tocilizumab	Genentech Inc., Hoffmann-La Roche Ltd.	CHO	++
Prolia , Denosumab	Amgen	CHO	++
Simponi , Golimumab	Centocor Ortho Biotech Inc., Merck & Co	CHO	++
Stelara , Ustekinumab	Centocor Ortho Biotech Inc.	CHO	++
Yervoy , Ipilimumab	BMS	CHO	++
Zevalin , Ibritumomabtiuxetan	Biogen Idec., Bayer Shering Pharma AG	CHO	++
Bexxar , Tositumomab-I131	GlaxoSmithCline	Celule hibridoma	+++
Orthoclone Okt3 , Muromonab-CD3	Centocor Ortho Biotech Inc.	Ascite murine	+++
Soliris , Eculizumab	Alexion pharmaceuticals	Mielom murin	+++
Arzerra , Ofatumumab	GlaxoSmithCline	NSO	+++
Banlysta , Belimumab	Human Genome Sciences Inc.	NSO	+++
Synagis , Palivizumab	Abott Labs, MedImmune Inc.	NSO	+++
Tysabri , Natalizumab	Elan Pharmaceut., Biogen Idec.	NSO	+++
Erbitux , Cetuximab	ImClone Systems, BMS	Sp2/0	+++
Ilaris , Canakinumab	Novartis Pharmaceuticals	Sp2/0	+++
Remicade , Infliximab	Centocor Ortho Biotech Inc.	Sp2/0	+++
Reopro , Abciximab	Centocor Ortho Biotech Inc., Eli Lilly & Co	Sp2/0	+++
Simulect , Basiliximab	Novartis Pharmaceuticals Corp.	Sp2/0	+++
Zenapax , Daclizumab	Hoffmann-La Roche Ltd., PDL Biopharma	Sp2/0	+++
PROTEINE DE FUZIUNE– Fc			
Amevive , Alefacept	Astellas Pharma Inc.	CHO	++
Arcalist , Rilonacept	Regeneron Pharmaceut. Inc.	CHO	++
Nulojix , Belatacept	Bristol-Myers-Squibb	CHO	++

HORMONI

Gonal-F , Follitropin alfa	EMD Serono Inc.	CHO	++
OP-1 Putty , Osteogenic Protein-1	Stryker Biotech	CHO	++
Ovidrel , Choriongonadotropin- α	EMD Serono Inc.	CHO	++
Thyrogen , Thyrotropin- α	Genzyme Corp.	CHO	++
Serostim, Saizen , Zorbitive , Somatropin	EMD Serono Inc.	C127 murine	
Emdogain , proteinele smalțului dentar	Staumann USA	Porc	

CITOKINE

Neo Recormon , Epoetină β	Hoffmann-La Roche Ltd.	CHO	++
Procrit, Epogen , Epoetină α	Amgen, Centocor Ortho Biotech Inc.	CHO	++
Rebif , Interferon β -1a	Pfizer, Inc., EMD Serono, Inc.	CHO	++

FACTORI DE COAGULARE

Xigris , Drotrecogin α	Ely Lilly & Co	Hek293	+
Helixate , Factorul VIII FS	ZLB Behring	BHK	++
Kogenate , Factorul VIII FS	Bayer Shering Corp.	BHK	++
NovoSeven , Factorul VIIa	Novo Nordisk	BHK	++
Xyntha , Factorul VIII	Wieth Pharmaceuticals	CHO	++

INHIBITORI ENZIMATICI

ATryn , Antitrombină/ATIII	GTC Biotherapeutics	Lapte capră	+++
-----------------------------------	---------------------	-------------	-----

ENZIME

Elaprase , Idursulfază	Shire Pharmaceuticals	HT-1080	+
Activase, Cathflo Activase, Actilyse Alteplază	Genentech Inc, Boehringer Ingelheim Pharma KG	CHO	++
Hylenex , Cumulase , Hialuronidază	Medicult A/S, MidAtlantic Diagnostics, Inc, Halozyme Baxter Healthcare	CHO	++
Myozyme, Lumizyme Alglucozidază alfa	Genzyme Corp.	CHO	++
TNKase , Tenecteplază	Genentech Inc	CHO	++
Amphadase , Hialuronidază	Amphastar Pharmaceuticals	Bovine	+++
Creon , Pancrelipază	Abbott Products, Inc.	Porc	+++
Pancreaze , Pancrelipază	Ortho McNeil Janssen	Porc	+++
Vitrase , Hialuronidază	ISTA Pharmaceuticals	Oaie	+++

ANTISERURI

Atgam , Globulină anti-timocit	Pfizer, Inc	Ser ecvin	+++
Thymoglobulin Globulină anti-timocit	Genzyme Corp.	Ser iepure	+++
CroFab , Crotalidae Polyvalent Immune Fab	Savage Laboratories	Ser oaie	+++
DigiFab , Digoxine Immune Fab	Savage Laboratories	Ser oaie	+++

S-au căutat soluții pentru reducerea nivelului de acid N-glicolilneuraminic (Neu5Gc), cu potențial imunogen la om, în glicoproteinele terapeutice, între care se numără folosirea tehnologiei ARN antisens sau schimbarea condițiilor de cultivare a celulelor. Reducerea nivelului de Neu5Gc s-ar putea realiza prin includerea în mediul de cultură a butiratului de sodiu, înlocuirea carbonatului de sodiu cu hidroxid de sodiu, scăderea temperaturii de cultivare în faza staționară a culturii de celule. Ghaderi et al. (2010) arătau că cea mai simplă, rapidă și ieftină strategie pe care au identificat-o ei s-ar baza pe alimentarea celulelor cu acid N-acetilneuraminic (Neu5Ac), competitor metabolic, care ar determina o reducere dramatică a nivelului de Neu5Gc în proteinele recombinant secretate și însăși expresia endogenă a Neu5Gc [30]. Strategiile enumerate contribuie la reducerea nivelului Neu5Gc în glicoproteinele sintetizate, dar nu asigură eliminarea lui completă și, probabil, cea mai sigură metodă ar fi absența genei *Cmah*, care ar determina incapacitatea biosintezei *de novo* a Neu5Gc de către celule, (Ghaderi et al., 2012) [31].

3.3. Unele realizări ale transgenezei la plante

Am lăsat în mod deliberat la urmă prezentarea realizărilor din domeniul transgenezei la plante, întrucât la acest gen de organisme progresele și succesele acestei tehnologii sunt remarcabile și totodată unele dintre plantele transgenice și produsele lor sunt comercializate. Realizările ingineriei genetice la aceste organisme au depășit demult granițele laboratoarelor de profil, a încercărilor în câmpurile experimentale, culturile cu plante modificate genetic (MG) ocupând, de ceva vreme, suprafețe însemnate pe mapamond. Avantajele folosirii ingineriei genetice la plantele de cultură rezultă din caracterele (genele) împrumutate de la alte organisme, printre care menționăm: rezistența la boli și dăunători, toleranța la erbicide, frig, secetă, salinitate, îmbunătățirea calității recoltei, producerea de substanțe de interes medical, folosirea lor în fitoremediere etc. Tehnologiile de producere a semințelor la plantele de cultură MG, produsele culturilor MG și comercializarea lor aduc anual profituri importante atât companiilor biotehnologice de profil, cât și fermierilor.

Transgeneza la plante a stârnit însă și o serie de îngrijorări și chiar opoziție din cauza unor riscuri, care includ: dezvoltarea de superburuieni, de noi virusuri, de microorganisme rezistente la antibiotice, efecte nedorite asupra unor organisme ne-țintă, riscuri de sănătate la om (noi toxine și alergeni), reducerea biodiversității, dezechilibre în unele ecosisteme etc. Produse ale culturilor MG se folosesc nu numai în furajarea animalelor, ci și în alimentația omului, sub trei forme:

- semințe, fructe, legume MG (tomate, cartof, soia, porumb, orez, dovleci, pepeni, floarea soarelui etc);
- alimente ce conțin ingrediente de la plante MG (amidon, ulei, zaharuri, aminoacizi, vitamine etc);
- alimente ce conțin OMG (cum ar fi iaurt cu microorganisme MG), (Verma et al., 2011)[110].

Pentru integrarea și exprimarea în alt organism (plantă), construcția unei transgene trebuie să conțină o serie de componenți, să aibă o anumită structură:

- o secvență promotor adăugată transgenei pentru exprimarea ei corectă, care controlează când și unde va fi exprimată gena în plantă. Cel mai folosit promotor în transgenză la plantele de cultură este CaMV35S de la virusul mozaicului conopidei, care asigură un nivel înalt de expresie a transgenelor la plante;

- pentru a se exprima la un nivel ridicat, gena clonată este uneori modificată. De exemplu, gena *Bt* (pentru rezistență la insecte) conține un procent ridicat de perechi de nucleotide A-T, în timp ce plantele au în genom un procent mai mare de perechi de baze G-C. Bioinginerii au înlocuit perechi de nucleotide A-T cu G-C în gena *Bt*, fără să schimbe semnificativ secvența aminoacizilor în proteină, fapt ce a asigurat creșterea nivelului proteinei *Bt* în celulele plantelor;

- pentru mașinăria celulară este necesară marcarea sfârșitului (capătului) transgenei, care constă în secvențe semnal de terminare;

- pentru că încorporarea și expresia transgenelor în planta receptor este un eveniment rar, la acest "construct" al genei transferabile trebuie adăugată o genă marker selectabilă, care să permită selecția celulelor și țesuturilor plantei în care transgena s-a integrat cu succes. Aceste gene marker codifică proteine ce dau rezistență la unii agenți, care în mod normal sunt toxici pentru plante, cum ar fi antibioticele sau erbicidele (ca aceste gene selectabile să funcționeze au și ele nevoie de secvențe proprii promotor și de terminare), (Gupta, 2009) [38].

Etapele parcurse în obținerea de plante modificate (transformate) genetic, sunt următoarele:

- identificarea și izolarea genei de interes (a transgenei) care urmează a fi transferată la organismul dorit (de exemplu, rezistență la dăunători, la erbicide, toleranță la secetă etc);

- inserția genei într-un vector de transfer. În cazul folosirii ca vector a bacteriei *Agrobacterium tumefaciens*, gena va fi înglobată în plasmida *Ti* a acesteia (sau în *Ri* la *A. rhizogenes*), prin utilizarea tehnologiei ADN-recombinant;

- transferul genei de interes în genomul plantei țintă prin infectarea celulelor sau explantelor ei cu bacterii transformate genetic (ale căror plasmide conțin transgena) sau prin biolistică și inserția transgenei în cromosomii acesteia;

- selecția celulelor vegetale modificate genetic (care poartă transgena) prin utilizarea unor markeri selectabili (rezistență la antibiotice sau la un erbicid, de exemplu), situație în care doar celulele transformate genetic vor supraviețui;

- regenerarea de plante întregi din celulele sau explantele transformate genetic, folosind culturile de celule și țesuturi (micropropagarea *in vitro*);

- verificarea reușitei acțiunii de transgeneză (de transformare genetică) prin testarea funcționalității transgenei și a expresiei acesteia (manifestării caracterului țintit) la planta modificată genetic;

- controlul expresiei transgenei în țesutul potrivit, la momentul potrivit;

- verificarea transmiterii în descendență a caracterului urmărit, care atestă sau nu reușita operației de transformare genetică;

- realizarea de teste de biosiguranță cu aceste plante și evaluarea efectelor lor asupra mediului etc, [154].

Controlul procesului de transgeneză se face cu ajutorul unor gene marker ce conferă rezistență la antibiotice ca: bleomicina, cloramfenicolul, kanamicina, streptomicina, higromicina etc. Se folosesc frecvent genele pentru GUS (β -glucuronidază), NPT II (neomicin-fosfo-transferază), CAT (cloramfenicol-acetil-transferază), luciferază etc.

În cele peste 3 decenii scurse de la primele încercări de transgeneză s-a realizat o varietate de plante transgenice, manipulate genetic pentru: transferul rezistenței la diverși factori abiotici și biotici, transferul sterilității, compoziție ameliorată în aminoacizi a unor plante furajere, încetinirea procesului de maturare a fructelor la unele plante prin folosirea tehnologiei *ARN antisens*, transferul genelor pentru unele proteine de rezervă în semințe, sinteza unor produși de interes medical (vitamine, vaccinuri), inducerea sterilității semințelor (sistemul "terminator") etc.

Având în vedere importanța lor economică, plantele care au beneficiat în special de atenția specialiștilor în operațiile de inginerie genetică sunt: porumbul, orezul, rapița, bumbacul, soia, floarea soarelui, cartoful, tomatele, varza, salata și altele. Iată unele exemple:

Prin transferul genei pentru 5-enolpiruvatshikimat-3-fosfat-sintază (EPSPS) de la *Agrobacterium tumefaciens* (tulpina C4) la soia s-a indus plantelor toleranță la erbicidul glyfosat (Roundup). Astfel de culturi s-au obținut și la tutun și plop, prin transferul genei *aroA* de la *Salmonella typhimurium*.

Culturile rezistente la erbicide au devenit disponibile pe piață de la mijlocul anilor 1980. Glyphosatul este un erbicid intens utilizat de fermierii din SUA, care distruge buruienile prin intervenția asupra enzimei EPSP-sintaza. Geneticienii au modificat gena pentru această enzimă pentru a se activa în prezența glyphosatului, apoi gena a fost transferată la o serie de plante de cultură (bumbac, soia, rapiță, porumb, tomate) pentru a le induce rezistența la erbicid [127].

Pentru controlul dăunătorilor plantelor de cultură (insecte, viermi, nematode) fermierii folosesc pesticide sintetice, care reprezintă un pericol cert atât pentru sănătatea omului, cât și a mediului. Operațiunile de transgeneză au găsit și în acest caz soluții eficiente și mai prietenoase, care constă în producerea de către plante a unor proteine toxice pentru insecte. S-au dezvoltat astfel de culturi transgenice la bumbac, porumb, orez, soia, cartof, vinete, floarea soarelui, varză, tutun etc, prin împrumutarea genelor *Cry* (care codifică proteine cu efect insecticid) de la *Bacillus thuringiensis* (bacterie ce trăiește în sol), culturile fiind denumite *culturi Bt*. S-a constatat că transferul genelor *Cry* de la *B. thuringiensis* la plante de cultură, le conferă acestora rezistență la unii dăunători specifici, contribuie la creșterea recoltei lor și determină totodată o reducere evidentă a folosirii pesticidelor. Un exemplu de acest gen îl reprezintă bumbacul Bt, căruia i s-a transferat gena *Cry/Ac* de la *B. thuringiensis*, conferindu-i astfel rezistență la un dăunător notoriu – *Helicoverpa armigera* (Panda, 2008) [76]. Acest dăunător provoacă anual pagube de cel puțin 300 milioane de dolari în culturile de bumbac din India, iar costul insecticidelor folosite pentru combaterea lui se ridică anual la cca 660 milioane de dolari (Verma et al., 2011) [110].

Bacteria *B. thuringiensis* a fost descoperită în 1901 și ulterior s-a constatat că tulpini ale ei manifestă o toxicitate ridicată asupra larvelor unor insecte. În 1938 în Franța s-a produs și vândut prima dată un spray cu Bt pentru controlul la porumb a dăunătorului *Ostrinia nubilalis*. Sporii de *B. thuringiensis* conțin proteine *Cry* (denumirea vine de la *crystal protein*). Proteina Bt, ingerată de insecte prin consumul de plante MG, se activează la nivelul intestinului (care la insecte este alcalin, iar la om este acid), situație în care proteina suferă o despachetare și o degradare parțială, rezultând o toxină (delta-endotoxina), care produce pori intestinali, dezechilibru ionic la acest nivel, paralizia sistemului digestiv și în final moartea larvelor insectei (care încetează să se mai hrănească și în câteva ore mor de inaniție) [144].

Bacteria conține diferite gene *cry* (sau *Bt*), care au fost izolate, clonate, caracterizate și apoi transferate în celulele unor plante de cultură, unde s-au

exprimat la niveluri capabile să producă moartea unor dăunători specifici (Panda, 2008) [76]. În transgeneza unor plante de cultură s-au folosit diverse gene *cry*: *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1F* și *cry9C* (împotriva larvelor de fluturi); *cry3A* și *cry3C* (împotriva gândacilor și larvelor lor); *cry34* și *cry35* (împotriva unor specii de *Diabrotica* la porumb). Unele proteine Bt sunt mai rezistente la degradare. Este cazul proteinei Cry9C și pentru a evita potențialul ei alergen la om, EPA a autorizat varietatea Bt de porumb *Starlink*, transgenică pentru această genă, doar pentru utilizare în hrana animalelor (Snow et al., 2005) [98].

Primele culturi Bt de bumbac, porumb și cartof au fost comercializate în SUA în 1996. În India, prima cultură modificată genetic pentru consum uman, vânăta Bt, a fost aprobată în 2009, plantă căreia i-au fost transferate gena pentru proteina toxică Cry1Ac și două gene marker pentru rezistență la antibiotice (Verma et al., 2011) [110]. La început, culturile transgenice Bt au folosit gene *cry* unice și au fost realizate pentru controlul dăunătorilor *Ostrinia nubilalis* și *Diabrotica spp.* la porumb, și pentru dăunătorii *Spodoptera frugiperda* și *S. exigua* la bumbac. S-a constatat însă că prin transferul unei singure gene *cry* unele insecte dăunătoare nu erau afectate, fapt ce a determinat transferul a mai multor astfel de gene. Pentru lărgirea spectrului de acțiune împotriva unor insecte dăunătoare, s-au realizat varietăți de bumbac ce conțin 2 transgene Bt (de exemplu, *cry1Ac* și *cry2Ab*) sau porumb cu 6 transgene Bt. Au fost generate toxine Bt cu domenii de schimb diferite (și implicit cu rol diferit la receptorii de legare și în formarea porilor), care au fost combinate între ele (proteine hibride) pentru a le conferi noi specificități (Lemaux, 2009) [55].

Problema rezistenței culturilor Bt la unele insecte dăunătoare poate fi pusă și din alt unghi. În ameliorarea clasică, obținerea de forme de plante rezistente la boli și dăunători este posibilă prin transferul prin hibridare a unor gene de rezistență de la plante înrudite (sălbatică, în general). Se știe însă că unii dăunători dezvoltă în timp forme rezistente la anumite pesticide (toxine). Nu cumva și culturile transgenice Bt vor avea o soartă asemănătoare?! Cercetătorii au luat în calcul și această eventualitate. O strategie folosită pentru întârzierea apariției rezistenței insectelor la culturile Bt este cultivarea de refugii constituite din plante non-Bt lângă culturile Bt, în ideea că insectele se hrănesc cu plante din aceste refugii și astfel nu vor dezvolta rezistență la toxina Bt. Alte strategii se bazează pe transferul în aceeași plantă a două toxine (cu moduri diferite de acțiune), cultivarea în amestec a semințelor de la varietăți Bt și non-Bt, folosirea de promotori inductibili (care să asigure expresia genei Bt doar în timpul atacului insectelor), sau modificări aduse toxinelor. Se caută și alte soluții de

producere a culturilor de plante MG rezistente la insecte, bazate pe proteinele vegetative cu efect insecticid (Vips) de la Bt sau ARN de interferență (ARNi), (Lemaux, 2008) [54].

Pe lângă avantajele culturilor Bt în reducerea cantităților de insecticide folosite în combaterea unor dăunători, ele au impact pozitiv și asupra sănătății fermierilor, evitând operațiile repetate de stropire cu pesticide a plantelor (uneori manuale), dar și asupra sănătății consumatorilor produselor Bt, prin conținutul mai redus în pesticide al produselor. În cazul porumbului Bt, se reduce semnificativ și contaminarea boabelor cu micotoxine (Qaim, 2009) [83].

Pentru transferul rezistenței plantelor la unele virusuri, au fost clonate și apoi transferate plantelor genele proteinelor de înveliș ale virusurilor. Primele culturi comercializate, rezistente la viroze (și de altfel singurele până în prezent), au fost dovlecelul rezistent la virusul mozaicului galben și papaia rezistent la virusul petelor inelare. S-a reușit transferul la unele plante de cultură a rezistenței la virusul mozaicului tutunului (VMT), a mozaicului lucernei (VML), a mozaicului castraveților (VMC) etc. Rezultate promițătoare de acest gen s-au obținut la tutun, tomate, cartof, lucernă, papaia.

Carica papaya este un pom de dimensiuni mici, cu o durată scurtă de viață, originar din America Centrală și de Sud. Culturile de papaia din Hawaii au fost puternic afectate și decimate de virusul petelor inelare (PRSV) în anii 1980, virus transmis prin afide. Beachy et al. (citați de Snow et al., 2005) [98] au descoperit la sfârșitul anilor 1980 principiul că proteina de înveliș transgenică a virusului poate conferi plantelor de papaia rezistență la acest virus. S-au dezvoltat varietăți transgenice de papaia rezistente la virusul petelor inelare, prin transferul genelor pentru proteinele de înveliș ale virusului, care au fost apoi promovate în cultură, iar în prezent 80% din culturile cu papaia din Hawaii sunt modificate genetic.

Manipularea genetică a culturilor de plante pentru rezistență la fungi și bacterii este o misiune mai dificilă. În acest sens sunt studiate plantele care au rezistență naturală la astfel de infecții, rezistență conferită de proteinele legate de patogeneză (proteine PR), de enzime care degradează pereții celulelor fungice (chitinază), compuși și proteine antifungice, fitoalexine (Panda, 2008) [76]. Genele ce codifică aceste proteine pot asigura, prin transferul lor la unele plante de cultură, rezistență la agenți patogeni fungici și bacterieni.

Un alt obiectiv al cercetărilor de transgeneză a fost transferul de gene care să asigure unor plante de cultură rezistența la uscăciune și salinitate. Stresul de uscăciune provoacă senescența timpurie a plantelor. S-a demonstrat că prin

aplicarea de citokinină exogenă acest proces poate fi întârziat. De aici și ideea de a transfera plantelor de cultură gena *IPT*, care codifică enzima isopentil-transferaza. Citând o serie de autori, Sun et al. (2013) arată că prin folosirea unui promotor inductibil la deficitul hidric (P_{SARC}), se reduce semnificativ deficitul de recoltă în condiții de uscăciune al unor plante cum ar fi tutunul, orezul, arahidele. Bunăoară, culturile de arahide transgenice (P_{SARC}/IPT) au avut un sistem radicular mai bine dezvoltat, au păstrat rate mai înalte de fotosinteză, au produs o biomasă semnificativ mai ridicată în condiții de irigare redusă și o recoltă cu 30-35% mai mare decât plantele de control [101].

Pentru toleranța la săruri s-a identificat ca strategie transferul genei *atnhx1* de la *A. thaliana*, care mediază transportul Na^+ și K^+ în vacuolă, la plante de interes, influențându-se astfel dezvoltarea și toleranța lor la săruri. Strategia s-a dovedit fezabilă și a indus toleranța salină la unele plante de cultură ca tomatele, rapița, bumbacul și soia. Sun et al. (2013) au constatat în experiențele lor la arahide că expresia în exces a genei *atnhx1* în plante asigură toleranța la un conținut de până la 150 mM NaCl în sol și producerea de către plante a unei biomase ridicate și o toleranță superioară a lor la săruri în condiții de seară [101].

Prin transgeneză se caută și ameliorarea producției și calității recoltei la unele plante cultivate. O reușită de acest gen aparține cercetătorilor de la Institutul Național pentru resurse agrobiologice din Japonia, care au transferat genele specifice fotosintezei de la porumb la orez, pentru a eficientiza procesul de convertire a luminii în amidon de către plantele de orez, fapt ce a asigurat o creștere a recoltei cu 30%. Alte strategii menite să sporească recolta specifică unor plante urmăresc blocarea unor gene, care să șunteze transportul nutrienților spre anumite părți ale plantelor, părți ce nu vizează recolta (produsul/organul urmărit), cum ar fi acumularea amidonului în tuberculi la cartof și nu în frunze, sau acumularea acizilor grași în semințe la rapiță etc. S-au obținut plante transgenice care secretă acid citric la nivelul rădăcinilor lor, fapt ce asigură mobilizarea unor micronutrienți (calciu, fosfor, potasiu) legați la particulele de sol, care devin astfel disponibili plantelor (Panda, 2008) [76].

Una din realizările importante ale ingineriei genetice (mai ales pentru zona Asiei) este așa numitul *orez de aur* (Golden Rice) care conține o cantitate net superioară de β -caroten (precursor al vitaminei A) în endospermul semințelor față de orezul obișnuit. El a fost obținut prin transferul în genomul orezului a două gene: gena *psy* (pentru phyoten-sintază) de la *Narcissus pseudonarcissus* și gena *crt1* (pentru caroten-desaturază) de la *Erwinia uredovora* [136]. Reușita s-a produs în 2000 și aparține geneticienilor I.

Potrykus și P. Beyer, semințele de orez având culoarea galbenă (vezi coperta), iar conținutul lor în carotenoizi (în condiții de seră) fiind de 1,6 $\mu\text{g/g}$. Ulterior (în 2005), specialiști de la compania Syngenta au produs un "Golden Rice 2", prin transferul genei pentru phyoten-sintază de la porumb și a genei *crt1* de la "Golden Rice 1", orez care producea o cantitate de carotenoizi de 23 de ori mai mare decât primul (până la 37 $\mu\text{g/g}$). S-a constatat că β -carotenul din acest orez este convertit la om în vitamina A și că este chiar superior β -carotenului din spanac, [155]. Un concept asemănător a stat și la baza obținerii de plante transgenice de tomate cu nivel înalt de β -caroten. S-a transferat gena bacteriană *crt1*, pentru phyoten-desaturază (care convertește phyotenul în licopen) în genomul plantelor de tomate, fapt care nu a schimbat conținutul de carotenoizi în fructe, ci a crescut nivelul β -carotenului până la 45% din totalul de carotenoizi (Sharma et al., 2004) [92].

Pentru a combate deficiența în fier, care afectează cca 30% din populația lumii, s-a proiectat și obținut o formă de orez bogată în Fe. În acest caz s-au transferat în genomul orezului o genă pentru *feritină* de la fasole (capabilă să lege fierul) și o genă pentru fitază termo-tolerantă, ce asigură digestia fitaților (inhibitori ai absorbției Fe) de la fungul *Aspergillus fumigatus* (Luca et al, 2002, citați de Gupta 2009) [38, 136]. Alți autori au obținut plante transgenice de orez, având nivel mai ridicat de Fe și Zn în endospermul bobului, prin transferul genei pentru feritină de la soia, a cărei expresie a fost pusă sub controlul promotorului glutelină (glu-B-1 promoter), (Vasconcelos et al., 2003) [109]. Transferul la orez a genei pentru β -faseolină (6% lizină) de la fasole, sub controlul promotorului glutelină, a determinat un nivel de expresie a proteinei de 4% din totalul proteinelor din semințele de orez transgenic, (Zhenweiz et al., 1995 - citați de Mandal și Mandal, 2000) [65].

Sunt de asemenea numeroase încercări de îmbunătățire prin transgeneză a calității proteinelor unor plante (cereale și legume). Una din abordări urmărește transferul de gene ce codifică proteine bogate în aminoacizi cu sulf la mazăre (plantă a cărei proteine sunt bogate în lizină, dar sărace în metionină și cisteină), sau modificarea unor gene de la cereale care să asigure creșterea conținutului de aminoacizi esențiali în proteinele boabelor (de exemplu, în lizină), (Panda, 2008) [76].

Și la cartof s-a urmărit un obiectiv asemănător. Prin transferul la cartof a genei AMA1 pentru albumina din semințe de la *Amaranthus hypochondriacus* (bogată în aminoacizi esențiali), s-a reușit creșterea semnificativă a conținutului unor aminoacizi esențiali, dar și a celui de proteine totale în tuberculi. Transferul

genei ce codifică S-adenozil-metionin-decarboxilaza (γ SAMdc; SPE2) de la drojii la tomate a determinat creșterea nivelului poliaminelor spermidina și spermina în plante, ceea ce a contribuit la un nivel mai ridicat de licopen în tomate (după Sharma et al., 2004) [92]. Sunt preocupări de a modifica genetic sfecla de zahăr pentru a produce o enzimă ce transformă zaharoza în fructan, care are gustul dulce, dar nu este digerabil și deci nu adaugă calorii (Verma et al., 2011) [110].

Companiile "Florigene" (Australia) și "Suntory" (Japonia) au obținut, după 13 ani de cercetări în colaborare, trandafirul albastru, prin transferul genei pentru *delfindină* de la panseluțe și o variantă a genei pentru *dihidro-flavonol-4-reductază* (DFR) – în locul celei proprii, care să permită exprimarea pigmentului delfinidină. Acești trandafiri sunt comercializați în prezent peste tot în lume [133].

În categoria realizărilor OMG la plante putem include și sistemul de protecție, conceptul de "*genă terminator*"[150]. Pentru a asigura protecția semințelor plantelor MG produse de către companiile de profil spre a nu cultivate de către fermieri în culturi repetate (fără a procura anual materialul semincer), s-a inventat un sistem de inactivare a semințelor după maturarea lor. Sistemul (TPS – *technology protection system*) constă în 3 transgene:

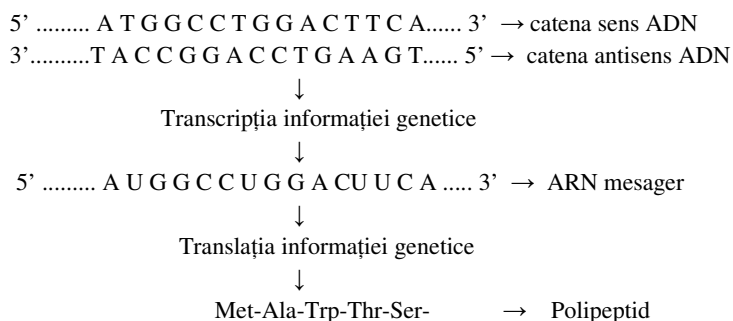
- o genă ce codifică o toxină care devine letală în momentul maturării semințelor;
- o genă ce codifică o recombinază (care poate înlătura un spacer de blocare aflat între promotor și gena letală);
- o genă represor al cărei produs se leagă de promotorul recombinazei, menținându-l inactiv.

Înainte de a fi comercializate pentru înființarea de culturi, semințele sunt muiate într-o soluție de tetraciclină, care împiedică sinteza proteinei represor. În acest fel, recombinaza este eliberată și poate înlătura spacer-ul de blocare, legând promotorul la gena letală, astfel încât semințele vor germina, vor genera plante normale ce vor fructifica, numai că după dezvoltarea completă a semințelor se activează promotorul care permite exprimarea genei letale și semințele își pierd viabilitatea. Această tehnologie a fost patentată în 1998 de către companiile Monsanto, Delat și Pine Land, patentul eliberat de USDA având nr. 5723765 și denumirea "Controlul expresiei genelor în plante" [150].

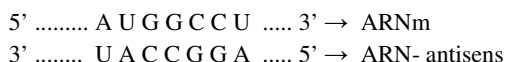
Deși acest sistem de protecție a tehnologiei de producere a semințelor MG are unele avantaje: de a nu permite răspândirea necontrolată a unei culturi MG sau de transfer a unui caracter nedorit la rude compatibile, tehnologia nu a fost

comercializată pentru că a stârnit numeroase critici. Cel mai important risc (temere a practicării ei) ar fi ca nu cumva prin polenizare încrucișată, sistemul să fie transferat de la plantele MG la cele non-MG și la rude sălbatice ale acestora, inducându-le astfel sterilitatea (Lemaux, 2009) [55]. Un alt sistem de acest gen este T-GURT (*trait-specific genetic use restriction technology*), la care modificarea genetică se exprimă la plante numai în prima generație. Spre deosebire de sistemul TSP, dacă semințele nu sunt activate înainte de semănat, ele vor da naștere la plante care nu manifestă caracterul MG (și nici plantele ce vor rezulta din răspândirea accidentală sau replantarea semințelor), [127].

O altă tehnică interesantă inventată de "inginerii geneticieni" este *ARN-antisens*. Folosind tehnologia ADN-recombinant se pot insera într-un organism gene sintetice, care codifică ARN-antisens, [135].



ARN poate forma (ca și ADN) un duplex, pe baza complementarității bazelor. Astfel:



Când ARNm formează un duplex cu o secvență de ARN complementară (cu un ARN-antisens, cu alte cuvinte) translația este blocată (fie ribozomul nu are acces la ARNm, fie duplexul de ARN format este rapid degradat de către ribonucleazele din celulă).

Prin această tehnică se poate realiza întârzierea coacerii unor fructe. O reușită de acest gen a fost reprezentată de tomatele transgenice "*Flavr Savr*" (devenite în 1994 primul aliment comercial MG aprobat pentru consum uman) [126, 142]. Fructele de tomate de pe piețele lumii pot proveni din zone îndepărate în care sunt produse, ele fiind culese înainte de coacerea deplină, pentru a rezista transportului și manipulării până să ajungă la consumator. Dacă fructele sunt într-un stadiu avansat de maturare, etilena sintetizată de ele determină coacerea lor rapidă și pierderi importante datorită degradării înainte

de a fi comercializate. Înmuiera fructelor este determinată în mare parte de pectinaze, enzime ce degradează pectina, un polizaharid din pereții celulari, care "cimenteză" celulele plantelor (ținându-le împreună). Enzimele pectice includ pectoliaza, pectozimul și poligalacturonaza (PG).

O cale de frânare a coacerii fructelor de tomate poate fi reducerea nivelului de PG din ele. Printr-o operație de inginerie genetică, cercetătorii de la Calgene au plasat gena PG cu orientare inversă față de promotorul CaMV35S, fapt ce a dus la transcripția unui ARN antisens, complementar cu ARNm normal (sens) al PG. În acest fel, plantele de tomate cu gena PG orientată antisens sintetizează PG la un nivel de numai 5-10% din cantitatea normală. După 1987, cercetătorii de la Calgene au produs linii de tomate care sintetizau doar 1% din cantitatea de PG din tomatele convenționale (Bruening și Lyons, 2000) [10]. Aceste fructe de tomate, a căror cantitate de PG este mult mai scăzută, vor avea culoarea și aroma obișnuite, dar se vor înmuia mult mai lent. Totodată, ele au un conținut mai ridicat în substanțe solide decât tomatele obișnuite (Panda, 2008) [76]. În paralel cu acțiunea de dezvoltare a liniilor de tomate PG-antisens, compania Calgene a făcut eforturi pentru comercializarea tomatelor "Flavr Savr" și au introdus pe piață produsul în mai 1994 pentru consumatorii din Davis și Chicago –SUA (fiind primul produs OMG care a primit licență pentru consum uman). Cererile au fost mari la început, dar produsul nu a fost niciodată profitabil din cauza costurilor de producție și distribuție, și a fost retras de pe piață în 1997 [142]. În 1996, firma Zeneca a introdus pentru comercializare pe piața din Marea Britanie pasta de tomate PG-antisens (tomate cultivate și procesate în California, SUA). Au fost livrate și vândute în intervalul 1996-1999 peste 1,8 milioane cutii cu pastă de tomate (produs marcat MG), numai că în august 1998 vânzarea produsului a scăzut dramatic din cauza sesizării de către mass-media că unii cercetători au ajuns la concluzia că șobolanii hrăniți cu cartofi MG au manifestat probleme de sănătate (Bruening și Lyons, 2000) [10].

O altă cale folosită pentru întârzierea coacerii fructelor de tomate a fost inserția unei gene antisens pentru enzima implicată în sinteza *etilenei*, prin reducerea cantității de ACC (acid 1-aminociclopropan-1-carboxilic) – precursor al etilenei (acțiune realizată prin transferul în genomul plantelor a unei versiuni trunchiate a genei pentru ACC-sintază). În acest fel, fructele produc doar 10% din cantitatea normală de enzimă, rezultatul fiind același ca și în cazul PG-antisens. În India, întârzierea coacerii tomatelor s-a realizat prin silențierea genelor ce codifică alfa-manozidaza și beta-D-N-acetiloxaminidaza [142].

Această tehnologie ARN-antisens a fost folosită și pentru modificarea compoziției uleiului la soia. În general, acest ulei conține acid palmitic (10%), acid stearic (4%), acid oleic (18%), acid linoleic (55%) și acid linolenic (13%), profil ce-i conferă stabilitate oxidativă scăzută. Pentru a contracara acest fenomen, cercetătorii s-au gândit că e necesar să fie augmentat procentul de acizi oleic și stearic din uleiul de soia și să fie redus cel de acid linolenic. S-au identificat două soluții: fie silențierea genei ce codifică Δ -12-desaturaza, fie a genei ce codifică Δ -9-desaturaza. Compania Du Pont a obținut în 2010 soia manipulată genetic, care prezenta un nivel de peste 80% acid oleic în ulei [143].

Totodată, prin tehnologia ARN anti-sens (sau a genelor knockout) sunt inactivate (silențiate) genele și astfel pot fi descoperite funcțiile lor într-un organism, observându-se schimbările fenotipice care apar la organismul în cauză (mai corect spus ce caracter sau caractere îi lipsesc). După cum, dacă la gena investigată se atașează un promotor puternic, are loc exprimarea ei în exces și în acest fel se pot evalua consecințele acestui eveniment asupra organismului astfel modificat.

Sunt preocupări pentru producerea de către plantele MG a unor proteine xenogene și acumularea acestora în anumite organe ale lor (semințe, tuberculi etc). În unele cazuri, astfel de proteine au fost produse și reținute în reticulul endoplasmatic al celulelor vegetale. S-au produs cu succes proteine specifice pânzei de paianjen în plante transgenice de tutun și cartof, (Scheller et al., 2001) [89]. Prin folosirea unor gene sintetice (de 420 la 3600 pb), autorii au constatat acumularea în RE al plantelelor transgenice a unei cantități de 2% astfel de proteine recombinant din totalul proteinelor solubile (cu omologie de peste 90% cu proteinele native). Proteinele recombinant erau rezistente la stresul termic și puteau fi precipitate selectiv cu ajutorul sulfatului de amoniu. Rezultate de acest gen au fost obținute și de alți autori. Astfel, Menassa et al. (2004) au testat posibilitatea de a produce în plantele de tutun transgenice a doi componenți proteici specifici mătăsii de paianjen (MaSp1 și MaSp2) de la *Nephila clavipes*. Constructul genic a constat și în doi promotori – CaMV35S și tCUP, aflați în legătură cu un semnal secretor al plantelor (PR1b), un stimulator translațional (AMV, de la virusul mozaicului lucernei) și un semnal de retenție (KDEL) în reticulul endoplasmatic, pentru exprimarea genelor în frunzele plantelor de tutun transgenice. Ambele gene s-au exprimat cu succes în plante, iar proteinele codificate de ele s-au acumulat atât în plantele cultivate în seră cât și la cele testate în câmp, [68].

O problemă serioasă a societății moderne este poluarea cu deșeuri nedegradabile din plastic și preocuparea pentru producerea de plastici biodegradabile. În acest sens, de un interes aparte se bucură polihidroxicarbonații (PHA), polimeri produși prin fermentație bacteriană dar, din păcate, sistemul presupune costuri ridicate și producție scăzută de polimeri. Plantele produc unii biopolimeri importanți cum ar fi amidonul și celuloza, fapt pentru care specialiștii s-au orientat spre manipularea genetică a unor plante pentru producerea de biopolimeri netradiționali, bioplastici. PHA sunt clasificați în două grupuri: cu lungime scurtă a lanțului și cu lungime medie a lanțului. Din prima categorie face parte și polihidroxibutiratul (PHB). Fiecare tip de PHA constă din 1.000-10.000 de monomeri. Folosirea plantelor transgenice în producerea de PHA s-a bazat pe faptul că unele plante furnizează o biomasă ridicată, dar și pe prezența în celulele acestora a acetil-CoA, precursorul biosintezei de PHA. Pentru obținerea de PHB este necesar transferul genelor *phbA*, *phbB* și *phbC* de la *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) la plantele vizate ca gazdă. Cum în plante acetil-CoA este prezentă în citoplasmă, plastide, mitocondrii și peroxizomi, sinteza PHA ar putea fi realizată în oricare din aceste compartimente (Yunus et al., 2008) [123].

Genele PHA de la bacteria *Alcaligenes eutrophus* s-au exprimat în plantele de *Arabidopsis thaliana* la un nivel de 100 μg/ s. pr. și de 500 μg/ s. pr. în culturile de celule în suspensie. S-a ținut apoi biosinteza PHA în plastide și s-a realizat un nivel de 10 mg/g s. pr. Prin urmare, dirijând producerea PHA din citosol în plastide s-a reușit o creștere de producție de 100 de ori (Nawrath et al., 1994 – citați de Sharma et al., 2004) [92]. Genele specifice PHB de la *A. eutrophus* (care codifică enzime ce convertesc acetoacetyl-coenzima A la PHB) au făcut obiectul unor operațiuni de transgenetă la cel puțin 11 specii, printre care amintim: *Arabidopsis*, tutunul, napul, inul, bumbacul, lucerna, plopul, palmierul de ulei etc. Pentru exprimarea PHB s-a folosit un promotor constitutiv puternic (CaMV35S). Deși abordarea s-a dovedit fezabilă tehnic, din punct de vedere comercial nu a dat rezultatele scontate, deoarece producerea PHB determină o reducere a vigoriei și recoltei (productivității) plantelor, (Dalton et al., 2012) [14]. Consumul metabolic pentru producerea PHB determină reducerea creșterii. Autorii amintiți au transferat genele PHB la plop și au observat efectul negativ al producerii PHB asupra substanței uscate din plante și fluorescența clorofilei, un indiciu al stresării plantelor. Plantele care produceau peste 1% PHB (s.u. în frunze) au avut o creștere cu 20-30% mai scăzută decât cele ce produceau sub 1% PHB [14]. Deși o recoltă de 1-2% PHB pare

încurajatoare, ea este departe de ținta comercială de 12,5%. Citând o serie de autori, Yunus et al., (2008) consideră că pentru producerea de PHA trebuie dezvoltate noi tehnologii de transformare a plantelor, cum ar fi transformarea plastidelor cu gene policistronice, operație care ar putea fi mai eficientă decât transferul transgenelor în genomul plastidial [123].

Un proiect interesant de transgeneză îl reprezintă obținerea de ”plante ce luminează”, proiect care urmărește transferul genelor pentru bioluminescență de la gândacii cu această capacitate (din familia *Lampyridae*) la unele plante, în special la arbori, care ar putea astfel lumina (suav și rece) noaptea străzile și aleile, reducând dependența noastră de sursele clasice de energie (MacDonald Glenn, 2013) [60].

Ingineria genetică are perspective și în domeniul bio- și fito-remedierii, contribuind la îmbunătățirea unor condiții de mediu. Din informațiile prezentate de Lemaux (2009) aflăm că în India s-au obținut plante transgenice de muștar care exprimă în exces adenzin-trifosfat-sulfurilaza, gamma-glutamil-cistein-sintetaza și glutatión-sintetaza, plante care acumulează în frunzele lor de 3-4 ori mai mult seleniu decât cele de tip sălbatic. *Arabidopsis thaliana* a fost manipulată genetic pentru a exprima reductaza modificată a ionului de mercur bacteriană pentru detoxifierea de mercur, prin convertirea formei ionice a acestuia (mai toxică) în forma lui elementară Hg(0) (mai puțin toxică), acțiune reușită prin transferul aceleiași gene și în cazul speciei *Populus deltoides* – situație în care cantitatea de Hg(0) a crescut de 2-4 ori (fapt ce a demonstrat posibilitatea de a contribui la fitoremedierea solurilor încărcate cu mercur), iar plantele au acumulat mai multă biomasă decât cele de control [55].

Avantajele pentru mediu ale cultivării de plante transgenice pot avea și alte obiective:

- obținerea de recolte mai ridicate la aceleași investiții (transferul genei pentru fosfoenolpiruvat-carboxilază de la porumb la orez s-a soldat cu o creștere a recoltei acestuia cu 12%);
- obținerea de plante transgenice care supraviețuiesc pe soluri sărăturate sau în condiții de uscăciune etc, (Lemaux, 2009) [55].

Specialiști de la Universitatea Davis (California) au obținut plante transgenice de tutun care sechestrează excesul de sodiu în vacuole, fapt ce le conferă rezistență pe soluri salin . Sunt perspective ca prin utilizarea ingineriei genetice să se izoleze plante rezistente la condiții extreme, care să se constituie în plante ”pionier” în zonele aride, menite să asigure reinstalarea unor specii spontane și să contribuie astfel la reducerea deșertificării. Tot cu ajutorul

plantelor sau bacteriilor manipulate genetic (având capacitate de acumulare sau degradare) va fi posibilă cultivarea unor terenuri poluate cu substanțe industriale sau cu metale grele și redarea lor circuitului economic [127].

Controversele stârnite de culturile MG și produsele lor au provocat rețineri în rândul multor consumatori, pentru că rapoartele media au fost în general nefavorabile la adresa lor. Se așteaptă însă ca prin apariția culturilor MG din generația a doua (care vor avea caractere de producție și de calitate îmbunătățite) și printr-o informare mai corectă a opiniei publice privind impactul culturilor și alimentelor MG (în special asupra sănătății omului), să crească și nivelul de acceptare a lor în consum.

În finalul acestui capitol vom prezenta câteva din realizările în domeniul transgenezei la două specii de plante: una ierboasă (tutunul) și cealaltă lemnoasă (plopul). Informațiile ce urmează provin din două lucrări de sinteză publicate - la tutunul transgenic de către Jube și Borthakur (2007) [46], iar la plopul transgenic de către Ye et al. (2011) [122], informații care ne vor permite să înțelegem mai bine efortul de cercetare investit și câteva din rezultatele remarcabile obținute în operațiunile de transgeneză doar în cazul acestor două specii.

Mulți dintre cei care cunosc mai puțin cum stau lucrurile în acest gen de cercetări, se vor întreba desigur, de ce tutunul - o plantă atât de controversată, adulată de unii și blamată de foarte mulți alții?! Tutunul, prin particularitățile sale genetice, fiziologice și biochimice, a fost și rămâne una din plantele model în cercetările de citogenetică, hibridare interspecifică, cultura de țesuturi și celule *in vitro*, izolarea și fuziunea de protoplaști și obținerea de hibrizi somatici, susceptibilitatea la boli etc, dar și pentru cercetările de biologie moleculară. Întrucât tutunul este ușor de cultivat și de transformat genetic și are bine pus la punct sistemul de cultivare *in vitro* și de regenerare a plantelor în acest sistem, are o genetică moleculară bine cunoscută, harta lui genomică este aproape completă, produce o cantitate mare de biomasă etc, el reprezintă una din cele mai folosite plante și în acțiunile de transgeneză [46]. Tutunul (*Nicotiana tabacum*, $2n=48$) este un alotetraploid, având un genom de cca 4,5 Gb, un nivel ridicat al repetițiilor în genom (peste 70%), un metabolism bogat (peste 4000 de componente chimice) și o mare capacitate de expresie a proteinelor (peste 40% din substanța uscată), (Sierro et al., 2014) [94].

Tutunul a fost utilizat în exprimarea unor transgene provenite de la diverse organisme. În tabelul 11 prezentăm o serie de gene bacteriene transferate

la tutun și însușirile dobândite de plantele transgenice (proteinele codificate și funcția lor).

Tabel nr. 11 - Proteine recombinant bacteriene exprimate în tutunul transgenic (după Jube și Borthakur, 2007)

Bacteria	Gena	Proteina exprimată	Funcția	Referințe
<i>Pseudomonas syringae</i>	argK	ROCT ornitina carbamoiltransferaza	Rezist. la <i>P. syringae</i> pv. phaseolicola	Hatziloukas și Panopoulos, 1992
<i>Halobacterium halobium</i>	bo	Bacterio-opsina (BO)	Rezist. la <i>P. syringae</i> pv. tabaci	Rizhasky și Mittler, 2001
<i>Ralstonia solanacearum</i>	popA	PopA	Rezist. la Phytophthora parasitica var. nicotianae	Belbahri et al., 2001
<i>Escherichia coli</i>	entC	Isocorismat izomerază	Producere acid salicilic	Verberne et al., 2000
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	pmsB	Piruvat liază	Producere acid salicilic	Verberne et al., 2000
<i>Erwinia carotovora</i>	expI	N-oxacil-homoserin lactona (OHL)	Rezist. la <i>Erwinia carotovora</i>	Mae et al., 2001
<i>Bacillus sp. 240B1</i>	aiiA	Acil-homoserin lactonază	Rezist. la <i>Erwinia carotovora</i>	Dong et al., 2001
<i>Bacillus thuringiensis</i>	cry 2Aa	Proteina Cry2A2	Rezistență la insecte	Kota et al., 1999
<i>Actinomyces A19249</i>	choM	ChoM	Rezist. la larve de <i>Anthonomus grandis</i>	Corbin et al., 2001
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ipt	Citokinin izopentil transferază	Rezist. la larve de <i>Manduca sexta</i>	Smigogcki et al., 1993
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	bar	PPT acetiltransferaza	Toleranță la bialafos	Lutz et al., 2001
<i>Escherichia coli</i>	aroA-M1	EPSPS	Toleranță la glyfosat	Wang et al., 2003
<i>Arthrobacter oxidans</i>	pcd	PMPH	Toleranță la fenmedifam	Strber et al., 1994
<i>Ralstonia eutrophus</i>	tfdA	2,4-D monooxigenaza	Toleranță la 2,4-D	Lyon et al., 1989
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	pqrA	Proteina de rezist. la paraquat	Toleranță la paraquat	Jo et al., 2004
<i>Escherichia coli</i>	betA	CDH	Toleranță sporită săruri	Holmström et al., 2000
<i>Escherichia coli</i>	betB	BADH	Toleranță sporită săruri	Holmström et al., 2000
<i>Arthrobacter pascens</i>	cox	Colin oxidaza	Toleranță sporită săruri	Huang et al., 2000
<i>Erwinia uredoovora</i>	crtZ	β-caroten hidroxilaza	Toleranță sporită UV	Götz et al., 2002
<i>Synechococcus vulcanus</i>	desC	Acil-lipid desaturaza	Toleranță sporită frig	Orlova et al., 2003
<i>Escherichia coli</i>	merA	Mercuric ion reductaza	Degradare mercur	He et al., 2001
<i>Enterobacter cloacae</i>	nsfI	NR	Degradare TNT	Hannink et al., 2001
<i>Enterobacter cloacae</i>	onr	PETN	Degradare TNT	French et al., 1999
<i>Bacillus anthracis</i>	pag	Proteina PA	Vaccin antrax	Watson et al., 2004
<i>Clostridium tetani</i>	tetC	Subunitatea C toxina tetanosului (TetC)	Vaccin tetanos	Tregoning et al., 2003
<i>Escherichia coli</i>	ltb	Subunitatea B LT	Vaccin gastroenterită	Kang et al., 2003
<i>Escherichia coli</i>	eae	Intimina	Vaccin <i>E. coli</i> O157:H7	Judge et al., 2004
<i>Vibrio cholerae</i>	ctb	Subunitatea B CT	Vaccin holeră	Danieli et al., 2001
<i>Escherichia coli</i>	mtlD	Manitol-1-fosfat dehidrogenaza	Producere manitol	Tarczinski et al., 1992
<i>Ralstonia eutropha</i>	phbA	β-ketotiolaza	Producere PHB	Bohmert et al., 2002
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	e1	Celulaza endo-1,4-β-D-glucanaza (E1)	Producere celulază	Jin et al., 2003
<i>Bacillus licheniformis</i>	amyl	α-amilaza	Producere α-amilază	Pen et al., 1992

Parcurgând datele inserate în acest tabel, constatăm cât de mare și diversă este gama de însușiri dobândite de plantele transgenice de tutun prin transferul unor gene bacteriene. Ele conferă plantelor rezistență la o serie de boli și dăunători, toleranță la unele erbicide (bialafos, glyfosat, fenmedifam, 2,4-D, paraquat), toleranță sporită la anumite condiții de mediu (săruri, UV, frig), capacitatea de a degrada sau neutraliza unele substanțe toxice (TNT, mercur), capacitatea de a produce vaccinuri (împotriva antraxului, tetanosului, holerei etc), unele substanțe utile (manitol, polihidroxibutirat) și enzime (celulază, α –amilază) etc.

Dintre plantele lemnoase, plopul s-a dovedit de asemenea o plantă model pentru cercetările de biologie moleculară, inclusiv în transgeneză. Speciile genului *Populus* sunt de altfel dintre cele mai rapid crescătoare în regiunile cu climat temperat, fiind folosite ca materie brută în industria forestieră și drept combustibil în zonele rurale ale țărilor în curs de dezvoltare. Toate speciile de plop sunt dioice și s-au dovedit a fi paleopoliploizi, având $n = 19$. Deoarece sunt gazde naturale pentru *Agrobacterium tumefaciens* și *A. rhizogenes*, era de așteptat ca și transformarea lor genetică prin intermediul acestor bacterii să fie posibilă, eficiența acestei acțiuni dovedindu-se însă, în mare măsură, dependentă de genotip. S-au elaborat protocoale de lucru vizând inducerea calusului, transformarea celulelor și regenerarea de lăstari și plante transgenice de plop, iar expresia transgenelor inserate în genomul acestora s-a dovedit stabilă (Ye et al., 2011) [122]. Iată în tabelul 12 câteva din reușitele de transgeneză la plop, care au asigurat plantelor rezistență la insecte, boli, erbicide și la unii factori abiotici.

Tabel nr. 12 - Plante transgenice de *Populus* sp. rezistente la stres
(după Ye et al., 2011)

Tipul de stres	Tipul de rezistență	Transgena	Referințe
Rezistență la insecte	Bt	Toxine Bt	McCown et al., 1991
	Alternative la Bt	Cry 3A	James et al., 1999; Génisiel et al., 2003
	Alternative la Bt	Inhibitorul de tripsin proteinază Kt3	Confalonieri et al., 1998
	Alternative la Bt	Inhibitorul cistein proteinazei de Arabidopsis (Atcys)	Delledonne et al., 2001
	Alternative la Bt	Neurotoxina de scorpion AaIT	Lin et al., 2006
Rezistență la boli	Patogeni fungici	Gena bacterio-opsina (bO)	Mittler et al., 1995; Mohamed et al., 2001
	Patogeni fungici	Stilben sintaza (StSy)	Giorcelli et al., 2004
	Patogeni fungici	Defensina (NP-1)	Zhao et al., 1999
	Patogeni fungici	Gena chitinazei (CH5B)	Lin et al., 2006
	Patogeni fungici	Gena de tip-germin oxalat oxidază	Liang et al., 2001
	Patogeni fungici	Peptide anti-microbiene	Liang et al., 2002; Powell et al., 2006
	Patogeni bacterieni	Peptidul antimicrobian D4E1	Mentag et al., 2003
Rezistență la erbicide	Glyfosat	AroA: 5-enolpiruvil-3-fosfoshikimat sintaza (EPSPS)	Fillati et al., 1987; Riemenschneider et al., 1988; Donahue et al., 1994; Karnosky et al., 1997

	Glyfosat	CP4	Meilan et al., 2000, 2002; Li et al., 2008
	Clorsulfuron	Gena acetolactat sintază crs1-1	Brasiliero et al., 1992
	Cloroacetanilidă	γ -glutamilstein sintază (γ -ECS)	Gullner et al., 2003
	Glufosinat	BAR	Chuveau et al., 1994
	Glufosinat	Glutamin sintază (GS)	Pascual et al., 2008
Rezistență la factori abiotici	Secetă și salinitate	Manitol-1-fosfat-dehidrogenază (mt1D)	Hu et al., 2005
	Secetă și salinitate	Domeniul-AP2/ERF responsabil acid iasmonic	Li et al., 2009
	Azot scăzut	Glutamin sintază (GS)	Gallardo et al., 1999; El-Khatib et al., 2004; Man et al., 2005; Pascual et al., 2008
	Temperatură scăzută	Factorul de legare C-repeat (CBF1)	Benedict et al., 2006
	Temperatură scăzută	Izopren sintază	Behnke et al., 2007
	Hidrocarburi volatile mici	Citocromul P450 2E1	Doty et al., 2007
	Toleranță la mercur	Reductaza ion mercurică (mer A), organomercur liaza (merB)	Lyyra et al., 2007
	Metale grele ca Zn	Glutamilstein sintetaza	Bittsászky et al., 2005

Prin diverse abordări de inginerie genetică s-a reușit transferul la plop și a unor gene care au determinat schimbarea caracterelor ce vizează creșterea și dezvoltarea plantelor: intensificarea rizogenezei, o rată de creștere modificată, înflorire timpurie, schimbarea staturii plantei (piticism). S-au obținut totodată plante transgenice de plop la care s-a modificat biomasa, precum și unele însușiri ale biomasei, importante din punct de vedere bioenergetic (tab. 13).

Tabel nr. 13 - Plante transgenice de *Populus* sp. pentru însușiri ale biomasei și pentru bioenergie (după Ye et al., 2011)

Transgena	Mod de abordare	Rezultate	Referințe
4 CL	Antisens	Reducere cu 50% a conținutului de lignină	Li et al., 2003
C3H	ARNi	O reducere semnificativă a conținutului total în lignină și creșterea raportului S/G	Coleman et al., 2008
CCoAOMT	Antisens	Reducerea conținutului în lignină	Zhong et al., 2000; Meyermans et al., 2000
COMT	Sens	17% reducere a nivelului ligninei	Jouanin et al., 2000
CCR	Sens și antisens	50% reducere conținut lignină cu creștere compensatorie a conținutului de celuloză	Leple et al., 2007
CAD	Antisens	Lipsă schimbări în conținutul de lignină și raportul S/G	Baucher et al., 1996; Lapierre et al., 1999
COMT	Antisens	Reducerea raportului syringil (S) / guaiaacyl (G)	Van Doorselaere et al., 1995; Lapierre et al., 1999; Tuskan et al., 2006
F5H	Expresie în exces	O creștere dramatică a raportului S/G, fără schimbări în conținutul de lignină	Franke et al., 2000; Li et al., 2003
4Cl și F5H	Co-transferul 4CL antisens și F5H sens	52% mai puțină lignină, un raport S/G cu 64% superior și 30% mai multă celuloză	Li et al., 2003

Xiloglucanază	Expresie în exces	Creștere sporită și acumulare celuloză	Park et al., 2004
UDP-glucoză pirofosforilază	Expresie în exces	Creștere în conținutul de celuloză	Coleman et al., 2007

* Raportul S/G: S – structuri ligninice de tip syringyl; G – structuri ligninice de tip guaiacyl

În ciuda unor rețineri și temeri, cei ce cred în potențialul ingineriei genetice consideră că ea are un viitor asigurat, că va fi capabilă să dezvolte culturi și produse agricole cu totul noi, care să ofere producției mai mari, pe un spațiu mai redus și cu un impact mai scăzut asupra mediului, că va fi cea ce va provoca o nouă ”revoluție verde”, că va contribui la creșterea bunăstării omului prin prețuri de cost mai mici ale alimentelor și al unor medicamente [127]. Ingineria genetică de abia a început să se facă simțită în viața noastră. Cu siguranță ea va continua să ne ofere tot mai multe surprize.

3.3.1. Producerea de către plantele transgenice a unor substanțe de interes medical

Operațiile de inginerie genetică la plante vizează, așa cum am arătat anterior, și producerea cu ajutorul plantelor MG a unor substanțe de interes medical. Folosirea plantelor în acest scop prezintă unele avantaje și dezavantaje.

Printre avantaje enumerăm:

- producerea de plante transgenice este mai simplă, mai puțin costisitoare și mai rapidă decât obținerea de animale transgenice;
- riscurile de transmitere a unor boli prin intermediul produselor lor scad, pentru că patogenii plantelor nu infectează celulele animale și umane (spre deosebire de producerea acestor proteine în celulele de mamifere sau în laptele acestora, care poate facilita transferul unor virusuri);
- produsul de interes se poate obține într-un timp scurt, întrucât plantele se maturează de regulă într-un singur sezon;
- prin intermediul unor plante transgenice, cum ar fi porumbul și tutunul, care generează o biomasă bogată, se pot obține cantități mari de produși țintiți, fapt ce ar asigura reducerea prețului acestora la consumatori;
- proteinele farmaceutice recombinant se pot acumula în semințele unor plante MG (ca porumbul, orezul și orzul), în care își pot păstra timp îndelungat stabilitatea (Sharma et al., 2004; Ubalua, 2009) [92, 107].

Dintre inconvenientele sistemului, menționăm:

- există diferențe în folosirea codonilor între plante și procariote, fapt ce poate face inefficientă expresia unor proteine procariotice în plante;

- proteinele în plante pot atașa unele polizaharide;
- unele plante pot produce compuși alergenic (Sharma et al., 2004) [92].

Iată câteva exemple de proteine recombinant farmaceutice produse de porumbul transgenic: hormonul de creștere uman, prin inserția genei specifice în ADN-ul cloroplastelor de tutun; anticorpi specifici unor agenți infecțioși (precum HIV, virusul respirator sincițial – RSV, virusul herpetic); proteine antigen folosite ca vaccinuri (vaccinul antilinfom, specific de pacient); alte proteine utile - cum ar fi lizozimul și tripsina etc [135].

Încă de la începutul anilor 1990 s-a urmărit evaluarea capacității plantelor MG de a produce substanțe de interes medical, în special vaccinuri antigen. Citând o serie de autori, Lemaux (2008) prezintă unele realizări de acest gen, printre care: producerea de către tutun a unei proteine antigen bacteriene de suprafață pentru prevenirea cariilor dentare, sau a unui antigen de suprafață al hepatitei B. Astfel de experiențe s-au realizat și la alte specii de plante MG ca porumbul, cartoful, orezul, soia și tomatele, și au urmărit obținerea unor vaccinuri pentru om și animale, ca: vaccin împotriva ciumei pneumonice și bubonice, polen MG vaccin pentru reducerea simptomelor la suferinzii de alergii, un vaccin ”comestibil” (oral) bazat pe orez MG pentru unele boli alergice precum astmul, alergiile de sezon, dermatitele atopice. De precizat că, reglementările din SUA nu permit realizarea de suplimente nutritive din plantele MG care conțin produși farmaceutici sau industriali, că FDA interzice alimentele ”falsificate”, inclusiv pe cele provenite din culturi MG ce conțin proteine potențial nocive (Lemaux, 2008) [54].

Așa cum a reieșit din cele expuse anterior, printre proiectele ingineriei genetice figurează și realizarea cu ajutorul plantelor manipulate genetic a vaccinurilor. În numeroase zone sărace ale lumii, milioane de copii nu au acces la imunizarea împotriva unor boli infecțioase, pentru că pur și simplu sistemul nu există sau pentru că este foarte costisitor. De aceea e nevoie de o soluție care să asigure vaccinuri mai ieftine, ușor de administrat, conservat și transportat, de un sistem acceptabil de eliberare a lor, pentru ca fiecare copil de pe lumea asta să beneficieze de imunizarea la unele boli care seceră multe vieți sau provoacă handicapuri importante. Or, tocmai producerea de către plante a unor proteine antigen pare să fie această soluție miracol. Vaccinurile derivate din plante par să aibă perspectivă și pentru unele boli ca diabetul de tip I, scleroza multiplă, artrita reumatoidă etc. Dacă aceste proteine ”medicament”, pot fi comestibile, cu atât mai convenabil și mai ușor de administrat.

Exprimarea unui antigen în celulele plantelor este considerată ca un fel de bioincapsulare pentru administrarea lui orală, peretele celular vegetal servind drept barieră în degradarea lui enzimatică. Acest tip de vaccin antigen ingerabil pare a fi de viitor măcar pentru bolile ce implică infecția mucoaselor (Sharma et al., 2004) [92]. Abordarea apare ca relevantă mai cu seamă pentru patogenii enterici, imunizarea orală fiind capabilă să eliciteze mecanisme imune adecvate pentru inducerea de reacții de protecție (Dus Santos și Wigdorovitz (2005) [22]. Pentru a face o diferență între fructele și legumele ce intră în mod obișnuit în consumul omului și animalelor și cele manipulate genetic în scop medical, cum ar fi și obținerea de vaccinuri, s-a înlocuit conceptul de "vaccinuri comestibile" (*edible vaccines*) cu cel de "antigeni vaccin derivați din plante" (*plant-derived vaccine antigens*).

Selecția regiunilor epitop importante de la patogenul de interes pare a fi un factor cheie în realizarea de vaccinuri comestibile. Un astfel de vaccin trebuie să fie sigur, să nu fie patogen, să fie capabil de a induce atât imunizarea mucoaselor cât și sistemică (după ingerare), să reziste la mediul acid din stomac și să ajungă la celulele țintă sub formă activă. La rândul lor, și plantele producătoare de vaccinuri orale trebuie să îndeplinească anumite condiții, printre care:

- să acumuleze antigenul de interes în cantități suficiente;
- să-i păstreze proprietățile imunomodulatoare;
- să nu producă efecte de interferare la procesarea antigenilor (Gunn et al., 2012) [37].

În tabelul 14 sunt redate avantajele și dezavantajele folosirii unor plante în producerea de vaccinuri comestibile.

Tabel nr. 14 - Avantajele și dezavantajele unor plante ca bioreactoare transgenice (după Gunn et al., 2012)

Planta/fructul	Avantaje	Dezavantaje
Tutun	Model bun pentru evaluarea proteinelor recombinant Sistem de conservare ieftin (numeroase semințe, păstrate timp îndelungat) Purificare ușoară a anticorpilor din semințe Recoltă mare, număr de ori/an	Produce compuși toxici *
Cartof	Domină încercările clinice Ușor de manipulat/transformat Ușor de propagat Conservare pe perioade lungi fără refrigerare	Necesită gătire (preparare), care poate denatura antigenii și reduce imunogenitatea**
Banane	Nu necesită gătire (preparare) Proteinele nu se distrug chiar dacă sunt preparate Necostisitoare Larg cultivate în țări în curs de dezvoltare	Pomii necesită 2-3 ani pentru maturare Pomii transformați au nevoie de 12 luni pentru a fructifica

		Se degradează rapid după maturare Conțin foarte puține proteine, și deci improbabil de a produce cantități mari de proteine recombinant
Tomate	Cresc rapid Se cultivă larg Conținutul înalt de vitamină A poate stimula răspunsul imun Poate depăși problema degradării prin tehnologii de răcire/uscarea Pudrele ce conțin antigen*** stabile, încapsulate Diverse loturi amestecate pentru a genera doze uniforme de antigen	Se degradează ușor
Orez	Folosit obișnuit în alimentația copiilor pentru că are potențial alergic redus Expresie înaltă a proteinelor/antigenilor Ușor de conservat/transportat Proteina exprimată este stabilă la căldură	Crește încet Reclamă condiții speciale de seră
Salată	Crește rapid Consumare directă Recoltă mare, număr de ori/an	Se degradează ușor
Soia, lucernă, pepene galben	Crește rapid Propagare ușoară prin semințe Ușor de transformat	
Alte plante	Morcov, arahide, grâu, porumb	

*Proteinele terapeutice sunt produse curent în tutun; ** Unele tipuri de cartof sud-americani pot fi consumați în stare proaspătă. Unele studii arată că prepararea nu distruge complet complementul antigenului în cartof;
*** Pudra de tomate răcită/uscată ce conține capsida NV și LT-B s-a dovedit imunogenă.

Plantele folosite în producerea de vaccinuri orale trebuie să prezinte unele însușiri, ca:

- pretabilitate la transformarea genetică;
- exprimarea antigenilor vaccin în țesuturi comestibile, care să permită consumul acestora în stare proaspătă (ei fiind sensibili la căldură);
- țesutul țintit pentru acumularea proteinei vaccin să fie bogat în proteine (întrucât vaccinul va reprezenta doar un procent scăzut din proteina totală);
- țesutul țintit nu trebuie să producă molecule toxice;
- să permită modificări post-tranlaționale necesare pentru împachetarea corectă a proteinei antigen (Tiwari et al., 2009) [103].

La început s-a folosit în acest scop ca plantă model tutunul, numai că acestei plante îi lipsesc unele din cerințele prezentate anterior. Ulterior, cercetătorii s-au orientat spre alte plante pentru producerea de vaccinuri orale:

- fructe de măr, bananier, tomate și guava;
- semințe de arahide, porumb, soia, năut;
- legume ca varza, salata, cartoful și spanacul.

De reținut faptul că frunzele nu reprezintă țesutul (organul) potrivit pentru acumularea acestor proteine antigen, deoarece: conțin un procent scăzut de proteine, au o activitate proteazică ridicată, prezintă pigmenți și compuși fenolici

(care complică acțiunea de purificare a proteinei recombinant și o fac dificilă și costisitoare), presupune manevrarea și prelucrarea unui volum mare de biomasă etc [103].

Potrivit informațiilor sintetizate de Kumar et al., (2013) [51], pentru producerea de metaboliți și proteine heteroloage de interes medical, atenția cercetătorilor s-a îndreptat și spre folosirea ca gazdă a unor specii de alge, cum ar fi: *Chlamidomonas reinhardii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Amphidinium carterae*, *Symbiodinium microadriaticum*, *Cylindrotheca fusiformis*. S-au făcut progrese și în producerea în cloroplastele transgenice a unor astfel de produși, în special vaccinuri și anticorpi. Plastidele combină unele însușiri de expresie ale proteinelor de la procariote și eucariote și de aceea par a fi de perspectivă în producerea de particule virale și de antigeni bacterieni, mai cu seamă că manifestă și niveluri înalte de expresie ale proteinelor recombinant.

Avantajele vaccinurilor orale față de cele injectabile (produse de celulele animale) sunt evidente: costă mai puțin, prezintă riscuri mici de contaminare, nu solicită condiții speciale de conservare (frig de exemplu), nu necesită mașini și utilaje speciale pentru a fi produse - ci terenuri agricole, costurile de producție a plantelor în câmp sunt mult mai mici decât producerea lor în bioreactoare, nu necesită folosirea de seringi și ace (care pot contribui la răspândirea unor boli), pentru administrarea lor orală nu este nevoie de personal medical de specialitate etc. În plus, plantele ca platformă de obținere a vaccinurilor, au avantajul producerii unei diversități de molecule recombinant (peptide, polipeptide, complexe proteice multimerice) care nu pot fi obținute în sistemele microbiene, și prezintă o mai mare flexibilitate în proiectarea de noi proteine farmaceutice (Kumar et al., 2013) [51].

Pentru realizarea de vaccinuri comestibile, se izolează genele ce codifică proteine antigen ale unor patogeni animal și umani, sunt transferate apoi unor plante (cum ar fi tomatele, bananierii, sau altele din cele prezentate în tabelul 14), iar prin consumul fructelor proaspete ale acestora se poate realiza imunizarea la unele boli. Această modalitate de vaccinare ar putea fi folosită împotriva unor boli umane ca holera și hepatita B (prin consumul de banane/tomate transgenice), sau a unor boli animale ca febra aftoasă la bovine (prin hrănirea cu sfeclă de zahăr transgenică), (Panda, 2009) [76]. În Argentina, virusul febrei aftoase (FMDV), rotavirusul bovin (BRV) și virusul diareei bovine (BVDV) sunt considerați ca fiind cei mai importanți agenți cauzatori de pierderi economice printre bovine. În acest sens, Dus Santos și Wigdorovitz

(2005) au dezvoltat o serie de experiențe menite să exprime și să producă proteine imunogene ale acestor boli în plantele transgenice de lucernă [22].

Primii care au demonstrat producerea de anticorpi de către plante ("planticorpi") au fost Hiatt et al. (1989), iar primul patent pentru un vaccin oral produs în plante (proteina de suprafață A de *Streptococcus mutans* exprimată în tutun) aparține lui Curtis și Cardineray, 1990 - citați de Kumar et al., 2013), numărul acestor determinanți antigenici împotriva unor boli virale și bacteriene sintetizați de plante transgenice fiind în continuă creștere (tab. 15).

Plantele pot deveni adevărate "bioreactoare" de producere pe scară largă a unor anticorpi, pentru că:

- pot asambla lanțuri proteice ușoare și grele în anticorpi întregi (compleți);
- pot asigura schimbările post-tranlaționale necesare producerii anticorpilor;
- în unele experiențe s-a ținut acumularea anticorpilor via RE → apoplast, zona extracelulară apoasă (un mediu relativ stabil), în care degradarea lor este minimă. Extragerea acestora este mai simplă și poate fi realizată în condiții mai blânde decât proteinele localizate în altă parte;
- stocurile de semințe de la plantele producătoare de anticorpi pot fi conservate indefinit, la un preț de cost redus (Fiedler și Conrad, citați de Sharma et al., 2004) [92].

Producerea unui anticorp complet funcțional în plante nu este totuși o misiune ușoară, din cauză că anticorpii sunt constituiți din mai multe subunități. În plante au fost exprimate diverse fragmente de anticorpi pentru blocarea acțiunii unor substanțe ca fitocromul, acidul abscisic, pentru sechestrarea unor poluanți organici, numai că aceste structuri nu sunt suficiente atunci când este vorba de activarea complementului sau de legarea la fagocite. Există mai multe strategii pentru expresia unor anticorpi întregi în plante, acțiune care presupune expresia a două gene (sinteza a două proteine) și asamblarea proteinei tetramerică într-un anticorp funcțional (Sharma et al., 2004) [92], aspect asupra căruia nu ne propunem să insistăm.

Tabel nr.15 - Expresia stabilă a unor determinanți antigenici în plantele transgenice (după Sharma et al., 2004)

Boala	Agentul	Antigenul	Planta	Nivelul de expresie	Imunizarea	Referințe
Hepatita	Virusul hepatitei B	Antigenul de suprafață al hepatitei B (HbsAg)	Tutun Calus lupin Frunze salată Cartof Cartof	Până la 0,01% TSP Până la 150 ng/g s.pr. Până la 5,5 ng/g s.pr. 1.1 µg/g tubercul 8,35 µg/g tubercul pr.	- Șoareci imunizați, răspuns anti HbsAg dezvoltat intraperitoneal. Șoarecii hrăniți cu calus de lupin au dezvoltat anticorpi specifici HbsAg. Voluntarii umani hrăniți cu salată transgenică au dezvoltat IgG ser specifică. Șoarecii hrăniți cu tuberculi transgenici au dezvoltat anticorpi specifici HbsAg, care s-a amplificat prin eliberarea intraperitoneală a unei doze subimunogene. Șoarecii imunizați oral au dezvoltat răspuns anticorp peste nivelul de protecție minim	Masson et al., 1992 Thanavala et al., 1995 Kapusta et al., 1999 Richter et al., 2000 Kong et al., 2000
Rabie	Virusul rabiei	Glicoproteina virusului rabiei	Tomate	1-10 ng/mg TSP	-	McGarvey et al.,1995
Dianea Traveller	<i>E. coli</i>	Subunitatea labilă a toxinei B (LT-B) Subunitatea labilă a toxinei B sintetice Subunitatea labilă a toxinei B sintetice Subunitatea labilă a toxinei B sintetice	Cartof Cartof Cartof Porumb	0,01% TSP 0,19% TSP 17 µg rec LT-B per gram tubercul -	Imunizare orală, răspuns imun elicitat la șoarece Șoarecii hrăniți cu tuberculi au dezvoltat anticorpi antiLTB și au fost parțial protejați împotriva provocării cu toxină labilă administrată oral Voluntarii umani imunizați oral cu tuberculi transgenici au dezvoltat anti-LT IgG și sIgA Imunizare subcutanee înalt elicitată anti/LT la șoarece. Imunizarea orală cu doza totală de 780 µg de recLTB per șoarece nu a stabilit titruri decelabile de anticorpi IgG1 sau IgA în ser. Șoarecii imunizați oral au dezvoltat anti-LTB IgG și IgA serum specifici în materialul fecal	Haq et al.,1995 Mason et al.,1998 Tacket et al.,1998 Lauterslager et al.,2001 Streitfield et al., 2001
Holeră	<i>Vibrio cholerae</i>	Subunitățile A și B ale toxinei holerei Subunitatea B a toxinei holerei (CTB) Subunitatea B a toxinei holerei Subunitatea B a toxinei holerei	Tutun Cartof Cloroplaste tutun Tomate	- 0,3% TSP 4,1% TSP 0,02% TSP în frunze și 0,04% TSP în fructe	- Șoarecii hrăniți cu tuberculi au manifestat anticorpi anti-CTB în ser și mucoase -	Hein et al.,1996 Arakawa et al., 1997 Arakawa et al., 1998 Daniell et al., 2001
Gastroenterită	Virusul Norwalk (NV)	Proteina capsidiei virusului Norwalk	Tutun, tomate	0,06-0,03% TSP	Imunizarea orală a dus la dezvoltarea de ser IgG și IgA secretor specific pentru NV la șoareci	Jani et al., 1996 Mason et al.
Dianea porcină	Virusul gastroenteritei transmisele (TGEV)	Proteina S a TGEV	<i>Arabidopsis thaliana</i> Tutun Cartof	0,1-0,2% TSP în frunze 0,02-0,07% în tuberculi	Șoarecii imunizați intranasular au dezvoltat răspuns specific anticorpi și a neutralizat infecția virală Porcii au fost imunizați intraperitoneal cu extracte din frunze de tutun. S-a declanșat un răspuns imun puternic specific TGEV Imunizarea intraperitoneală și orală la șoareci a condus la inducerea unui răspuns anticorp ser specific	Gomez et al., 2000 Tuboly et al., 2000 Gomez et al., 2000

Tabel nr. 16 - Vaccinuri obținute în plante aflate în faza de încercări clinice în desfășurare, neaprobați sau aprobați deja, dar necomercializați (după Kumar et al., 2013)

Nr.	Produsul	Planta gazdă	Indicații	Administrazione	Referințe
1	<i>E. coli</i> LT-B	Cartof Semințe porumb	Diaree	Orală	Tacket et al., 2007, 2009 Chikwamba et al., 2003
2	Virusul Norwalk	Cartof și tutun Tutun Fructe tomate (capsida)	Diaree	Orală	Tacket et al., 2000 Santi et al., 2008 Zhong et al., 2005
3	HbsAg	Cartof Banane Tutun Tomate cherry, Tutun	Hepatita B	Orală	Kong et al., 2001 Kumar et al., 2005 Kostrzak et al., 2009 Gao et al., 2003 Valdes et al., 2003
4	Virusul rabiei (GP/NP)	Spanac Tutun	Rabie	Orală	Modelska et al., 1998 Roy et al., 2010
5	Virusul HN al bolii Newcastle	Celule de tutun în suspensie Cartof	Boala Newcastle	Subcutanee	Yusibov et al., 2011 Gomez et al., 2008
6	Anti-idiotip scFV's personalizat	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Limfom non-Hodgkin	Subcutanee	Yusibov et al., 2011
7	Anti-idiotip de FV's personalizat	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Limfom non-Hodgkin	Subcutanee	Yusibov et al., 2011
8	H5N1 influenza HA VLP	<i>Nicotiana benthamiana</i>	H5N1 influenza "aviară"	Intramusculară	Yusibov et al., 2011
9	H5N1 influenza HAII	<i>Nicotiana benthamiana</i>	H5N1 influenza "aviară"	Intramusculară	Yusibov et al., 2011
10	H1N1 influenza HAC1	<i>Nicotiana benthamiana</i>	H1N1 influenza "porcină"	Intramusculară	Yusibov et al., 2011
11	Capsida proteică L1	Cartof Tutun Tutun	Virusul papilloma uman	Subcutanee Orală Intramuscular	Biemelt et al., 2003 Warzecha et al., 2003 Kohl et al., 2006
12	Antigenul protector (PA)	Tutun	Antrax	Subcutanee	Aziz et al., 2002 Koya et al., 2005
13	Proteina S	Tutun Tomate Tutun	SARS	Orală Orală Orală	Watson et al., 2004 Pogrebnyak et al., 2005 Webster et al., 2002
14	Proteina MV-H	Tutun Salată	Virusul pojarului	Intraperitoneală, intranazală	Webster et al., 2005 Webster et al., 2005
15	Proteina Spike	Porumb	Virusul suin al gastroenteritei transmisibile	Orală	Lamphear et al., 2004
16	Peptidul D2 al proteinei de legare fibronectină (FnBP)	Fasole pestră	<i>Staphylococcus aureus</i>	Intranazală, orală	Brenana et al., 1999

17	Proteina intimin	Tutun	E. coli O157:H7	Orală	Judge et al., 2004
18	Antigenul fimbrial Fae G al K88	Tutun	Tulpina 88 enterotoxigenă de <i>E. coli</i>	Intraperitoneală	Huang et al., 2003
19	Cry j1, Cry jII	Orez	Polen alergic de cedru japonez	Orală	Takagi et al., 2005
20	VP1	Lucernă Cloroplaste tutun	Virusul febrei aftoase	Parenterală Orală	Wigdorovitz et al., 1999 Li et al., 2006
21	Proteina F	Tomate	Virusul respirator sincițial y	Orală	Sandhu et al., 2000
22	SSA	Lupinul cu frunza îngustă	Albumina semințelor de floarea soarelui	Orală	Smart et al., 2003
23	B5	Tutun	Virusul influenza	Orală	Ashoji et al., 2008
24	Proteina de fuziune F1-V	Tomate	Ciumă	Orală	Alvarez et al., 2006
25	Peptidul 2L2I	Cloroplaste tutun	Parvovirusul canin	Parenterală	Molina et al., 2005
26	Proteina de înveliș (E)	Tutun Orez	Virusul encefalitei japoneze	Orală	Appiahgari et al., 2009 Wang et al., 2009
27	Antigenul ESAT-6	Arabidopsis	Tuberculoză	Orală	Rigano et al., 2005
28	VP6 HRV-VP7	Lucernă Cartof	Rotavirus	Orală	Yuan și Saif, 2002 Yu-Zhang et al., 2003

Se consideră că producerea de către plante a anticorpilor recombinant va avea un impact deosebit pentru sănătatea omului și va fi un domeniu în care se vor face mari investiții. Anticorpii produși de către plantele transgenice sunt de cca 10-50 ori mai ieftini decât cei produși de bacteriile transformate genetic. Conform datelor Asociației Medicale Americane, în fiecare an apar în SUA cca 650 mii de noi cazuri de cancer de sân, plămâni și colon, iar pentru tratarea unui pacient sunt necesare cca 10-200 mg de anticorpi recombinant anti-tumoral, ceea ce ar însemna o cerere de piață de cca 130 kg/an de produs numai în SUA (după Mahmoud, 2007) [63].

Se află în faza I de încercări clinice antigeni vaccin pentru diaree, gastroenterite la om, și porc, boala (diareea) Traveler, hepatita B și rabie. Datele obținute în aceste testări arată că antigenii vaccin derivați din plante transgenice sunt siguri și dezvoltă un răspuns imun suficient de ridicat la subiecții sănătoși. Sunt însă destule probleme tehnice și logistice până când aceste vaccinuri orale să devină o realitate, să fie aplicate. Inclusiv standardizarea și dozarea acestor vaccinuri este o problemă importantă, pentru că nivelul de expresie a acestor antigeni poate să difere de la o generație la alta, funcție de condițiile de cultivare și altele (Tiwari et al., 2009) [103]. Este neîndoielnic însă faptul că ziua când vom consuma unele legume și fructe pentru a ne proteja de o serie boli infecțioase se apropie. Vaccinurile comestibile apar ca o soluție salutară pentru populația țărilor subdezvoltate sau în curs de dezvoltare, unde accesul la vaccinurile de tip clasic reprezintă încă o problemă foarte serioasă.

În tabelul 16 sunt prezentate o serie de vaccinuri reprezentative obținute în plante mai recent (după Kumar et al., 2013), cu diverse sisteme de expresie, aflați în faza încercărilor clinice, neapropați sau aprobați deja de către organisme naționale de control și reglementare, dar necomercializați încă.

În ultimii ani s-a acordat atenție producerii de către plantele transgenice, în formă activă, și a altor proteine umane. În tabelul 17 prezentăm unele proteine recombinant terapeutice și de uz industrial obținute cu ajutorul plantelor, precum și domeniile lor de utilizare.

Tabel nr.17 - Proteine terapeutice și de uz industrial obținute în plante transgenice (după Sharma et al., 2004)

Proteina/Enzima	Planta gazdă	Utilizare	Referințe
Encefalina umană	<i>Arabidopsis</i> și uleiul din semințe de rapiță	Antihiperanalgezic prin activitate opiat	Vandekerckhove et al., 1989
Serum albumina umană	Cartof	Tratamentul cirozei ficatului	Sijmon et al., 1990
Peptidul inhibitor de convertire a enzimei	Tomate și tutun	Tratamentul hipertensiunii	Hamamoto et al., 1993

angiotensina-1 (ACEI)			
Factorul de creștere epidermală la om	Tutun	Proliferarea celulară în reparația/controlul rănilor	Higo et al., 1993
α -Trichosantina	<i>Nicotiana benthamiana</i> Tutun	Proteina de inactivare a ribozomului	Kumagai et al., 1993 Krishnan et al., 2002
Hirudina	Arabidopsis	Tratamentul trombozei	Paramenter et al., 1995
Eritropoietina	Tutun	Anemie	Matsumoto et al., 1995
Proteina C (hPc)	Tutun	Serum protează folosită în terapia de înlocuire în boala Gaucher	Cramer et al., 1996
Hemoglobina umană	tutun	Substituent sanguin	Dieryck et al., 1997
Briodin I	Tutun	Inhibitor al sintezei proteice	Francisco et al., 1997
Cazeină β -umană	Cartof	Hrană pentru copii și pentru prevenirea bolilor gastrice și intestinale la copii	Chong et al., 1997
GM-CSF murin	Tutun	Neutropenie	Lee et al., 1997
GM-CSF uman			James et al., 2000
Lactoferina	Tutun Cartof Orez	Proprietăți antimicrobiene	Salmon et al., 1998 Chong et al., 2000 Humphrey et al., 2002
Interleukinele umane IL-2 și IL-4	Tutun	Diagnostic clinic	Magnuson et al., 1998
β -Glucuronidaza	Porumb	Diagnostic	Kusnadi et al., 1998
α -Lactalbumina (umană)	Tutun	Proteină din lapte cu bună digestibilitate	Takase și Hagiwara, 1998
α -Lactalbumina (porcină sintetică)	Porumb		Yang et al., 2002
Preporicina	Tutun	Toxină proteică cu aplicații în multe boli și în sisteme model de boli ce implică apoptoza	Sehnke și Ferl, 1999
Aprotinina	Porumb	Inhibitor de serin-protează în chirurgia de transplant	Zhong et al, 1999
Avidina	Porumb	Biopesticid împotriva unor insecte, proteină de legare a biotinei folosită în diagnostic	Kramer et al., 2000
Somatropina umană	Cloroplaste tutun	Terapeutică	Staub et al., 2000
Acetilcolinesteraza umană	Tomate	Diagnostic și terapeutică	Mor et al., 2001
Interferon uman - α 2b și 8	Cartof	Diagnostic și terapeutică	Ohya et al., 2001
Peptidul SMAP-29	Tutun	Antimicrobian al imunității înnăscute	Morassutti et al., 2002
Avidina și Streptavidina	Tutun	Diagnostic	Murray et al., 2002

După cum a reieșit din cele prezentate anterior, succesele în obținerea unor proteine recombinant de interes medical la plante sunt numeroase, dar în privința utilizării lor terapeutice par să existe încă rezerve serioase. Așa se explică poate faptul că, până la mijlocul anului 2012, primise aprobare pentru uz uman doar *gluco-cerebrozidaza* (o enzimă absentă în *boala lui Gaucher*), [133, 135]. Enzima catalizează la om degradarea complexului de glicozilceramide, iar deficiența ei provoacă expansiunea măduvei osoase, deteriorarea oaselor și visceromegalie. Terapia bolii lui Gaucher constă în administrarea regulată bolnavilor de glucocerebrozidază umană (ceredază), un medicament extrem de

scump. Prin transformare genetică mediată de *Agrobacterium*, a fost transferată gena pentru această enzimă la tutun. Într-o anumită fază a cercetărilor, plantele transgenice de tutun produceau în frunze o cantitate de 10% din proteina solubilă (Cramer et al., 1996 – citați de Sharma et al., 2004) [92]. În prezent enzima este produsă în culturi de celule transgenice de morcov și tutun, medicamentul obținut și aprobat fiind denumit *Elelyso*, [133].

4. Considerații comparative privind eficiența diverselor sisteme de expresie a proteinelor recombinant

Unii autori (Wang et al., 2013) au comparat diferitele sisteme de expresie și producere a proteinelor recombinant terapeutice (bacterii, celule de mamifere, insecte, plante transgenice, animale transgenice), luând în seamă o serie de criterii (tab. 18) și au ajuns la concluzia că ”bioreactoarele” ideale pentru sinteza și obținerea de proteine farmaceutice umane complexe ar fi animalele transgenice [113].

Tabel nr. 18 - Comparații între diferite sisteme de producere a proteinelor farmaceutice recombinant (adaptat de Wang et al., 2013 – după Houdebine, 2009)

Caracteristici	Bacterii	Celule de mamifere	Animale transgenice
Nivel de producție	++	+	++++
Costuri investiții	+++++	+	+++
Costuri de producție	+++++	++	++++
Capacitate de extindere	+++++	+	++++
Colectare	+++++	+++++	++++
Purificare	+++	++++	+++
Modificări post-tranlaționale	+	++++	++++
Glicozilare	+	++++	++++
Stabilitatea produsului	+++++	+++	++++
Patogeni contaminanți	+++++	++++	++++
Produce pe piață	++++	+++++	+++

Dintre sistemele de expresie animale (albuș de ouă, lapte, sânge, urină, plasmă seminală, coconi de viermi de mătase) cel mai mare potențial în producerea de proteine farmaceutice recombinant au glandele mamare ale animalelor transgenice. Wang et al. (2013) compară capacitatea diverselor mamifere (porci, capre, oi, vaci, iepuri) de a produce în lapte aceste proteine, așa cum am discutat într-un capitol anterior, și opinează că iepurii sunt de preferat în acest sens, datorită unor însușiri ca: fertilitate ridicată, generații facile de fondatori și urmași transgenici, lipsă de sensibilitate la boli prionice, o producție de lapte relativ bună pentru proteinele necesare în cantități mai mici, faptul că nu

transmit boli grave la om. Ei consideră că iepurii sunt candidați atractivi pentru producerea de proteine recombinant în glandele mamare și că folosind acest sistem s-ar putea produce până la 50 de kg proteină/an [113].

Sunt însă autori (Merlin et al., 2014) [69] care consideră că plantele par să fie cele mai bune "biofabrici" pentru producerea la scară mare a unor proteine recombinant, iar concluzia lor se bazează pe argumente care nu pot fi contestate: capacitatea plantelor de a realiza majoritatea modificărilor post-tranlaționale (pe care le reclamă proteinele de la eucariote pentru a fi active), sunt mai flexibile când vine vorba de nivel (scara) de producție, costuri, biosiguranță, reglementare. Spre deosebire de platformele de producție bazate pe microbi sau mamifere, de exemplu, plantele au avantajul siguranței produșilor sintetizați, pentru că ele nu vor produce niciodată endotoxine, nu pot susține creșterea unor patogeni animalii. Ele pot asigura atât producerea la scară mai mică a unor proteine (folosind bioreactoare de diverse capacități pentru culturi de celule în suspensie sau de alge), dar pot fi folosite și în producerea la scară mare a unor proteine (în culturi de plante MG în câmp). Asta nu înseamnă că toate proteinele farmaceutice trebuie să se bazeze pe platformele de producție reprezentate de plante, ci trebuie ca producerea proteinelor recombinant să fie analizată de la caz-la-caz [69].

Merlin et al. (2014) au întreprins un astfel de studiu, în care – folosind date existente în literatura de specialitate, au analizat nivelul de producere, în diverse sisteme de expresie, a 4 proteine recombinant: glutamat decarboxilaza umană - izoforma de 65 kDa (hGAD65), proteina de înveliș a virusului Norwalk (NVCP), anticorpul monoclonal 2G12 și interleukina-6 umană (hIL-6). Autorii studiului [69] sintetizează în două tabele informațiile obținute în cazul producerii acestor proteine recombinant, atât în sistemele "tradiționale" (tab. 19), cât și în sistemele cele mai performante bazate pe plante (tab. 20), pe care le preluăm și noi aici (cu unele mici modificări).

Tabel nr. 19 - Nivelurile cele mai înalte de expresie a patru proteine recombinant obținute în platforme de producție "tradiționale" (după Merlin et al., 2014)

Proteina recombinant	Sistemul heterolog de expresie	Nivelul cel mai înalt de expresie
hGAD65	<i>Escherichia coli</i>	12,5 mg/mL
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,46 mg/mL
	<i>Pichia pastoris</i>	0,42
	Celule de <i>Spodoptera frugiperda</i>	0,02 mg/mL
	Celule de mielom de șoarece	1,67 mg/mL
NVCP	<i>Escherichia coli</i> *	56 mg/L
	<i>Pichia pastoris</i> *	10 mg/L

	Celule de <i>Spodoptera frugiperda</i> *	125 mg/L
	Celule BHK de hamster chinezesc*	10 ¹⁰ particule/mL
2G12	Clone hibridoma	10pg/celulă/zi
hIL-6	<i>Escherichia coli</i>	7,5 mg/mL
	<i>Pichia pastoris</i>	0,28 mg/mL
	Celule de <i>Spodoptera frugiperda</i>	0,001 mg/L

*Valorile raportate reprezintă recolta cea mai ridicată de proteină purificată sau parțial purificată pentru că lipsesc datele de expresie

Glutamat decarboxilaza (GAD) catalizează transformarea glutamatului în acid gamma-aminobutiric (GABA) și dioxid de carbon și prezintă două izoforme (codificate de gene diferite) GAD65 și GAD67, care au greutatea moleculară de 65 și respectiv 67 kDa. La om GAD65 formează dimeri funcționali și este localizată în celulele insulelor pancreatice și ale creierului. Aceste enzime reprezintă ținte antigenice pentru anticorpii persoanelor care dezvoltă diabet de Tipul 1 (T1D). Proteina hGAD65 funcționează ca auto-antigen în cazul unor boli autoimune, cum este și T1D. Auto-anticorpii hGAD65 sunt prezenți înainte de apariția semnelor clinice ale bolii și se pot constitui în marker util de predicție a dezvoltării T1D. Prevalența bolii în populația generală este de cca 0,04%, dar ea este în creștere cu 3% pe an. Studii efectuate pe modele animale au arătat că administrarea hGAD65 poate induce imunotoleranță, fapt ce a determinat trecerea la încercări clinice pe copii și tineri predispuși genetic să dezvolte boala, pentru a se verifica dacă injectarea cu două doze a 20μg de hGAD65 nu previne atacul bolii. Dacă aceste teste clinice se vor dovedi reușite, atunci cererile mondiale de hGAD65 vor crește într-un mod dramatic. Acoperirea solicitărilor va reveni producerii proteinei în sisteme heteroloage (Merlin et al., 2014) [69]. De aici și interesul unor cercetători de a testa capacitatea unor platforme de expresie în producerea acestei enzime, așa cum sunt prezentate în tabelele 19 și 20.

Virusul Norwalk (NV) este prototipul norovirusului uman (NoV) și aparține unui grup dintre cei mai infecțioși viruși, responsabili pentru peste 95% din epidemiile de gastroenterite virale la adulți. Se estimează că anual, în țările dezvoltate, NoV determină cca 1,1 milioane de spitalizări și cca 218.000 decese printre copii. Dezvoltarea unui vaccin împotriva acestui virus a fost dificilă din cauza cantității insuficiente de particule virale disponibile (singura sursă fiind scaunele umane, care conțin concentrații foarte scăzute ale virusului). Soluția la care s-a apelat a fost expresia proteinei majore a capsidului viral (VP1) în celulele de insecte. S-a constatat că proteina recombinantă VP1 se împachetează spontan în particulele de tip virus Norwalk (NVLP), iar studiile preclinice au arătat că sunt imunogene când sunt administrate pe cale parenterală, orală și intra-nazală. Pentru dezvoltarea unui vaccin împotriva virusului s-au testat o

serie de sisteme de expresie (bacterii, drojdii, celule de insecte infectate de baculovirus, celule de mamifere și sisteme bazate pe plante) pentru producerea proteinei de înveliș virale (NVCP) și pentru a se verifica apoi dacă proteina se auto-asamblează în NVLP [69]. În tabelele deja menționate se regăsesc rezultatele unora din aceste cercetări.

Tabel nr. 20 - Cele mai performante platforme de expresie, bazate pe plante, pentru producerea a patru proteine recombinant (după Merlin et al., 2014, modificat)

Planta gazdă	Organul plantei	Proteine recombinant	Sistemul de expresie	Nivelul cel mai înalt de expresie
<i>Nicotiana tabacum</i> (Tutun)	Frunze	hGAD65mut	Transgenic	0,14 mg/g LFW
		NVCP	Transgenic	0,2% TSP
		IL6_KDEL	Transgenic	0,11 mg/g LFW
		2G12/2G12_KDEL	Tranzitorie (Vector binar)	0,1 mg/g LFW
	Semințe	hGAD67/65mut	Transgenic	0,4 mg/g DSW
		IL6_KDEL	Transgenic	0,3 mg/g DSW
		2G12_KDEL/ELP	Transgenic	1,0% TSP
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Frunze	hGAD65mut	Tranzitorie (vectori MagnICON)	0,1 mg/g LFW
		NVCP (VP1 și VP2)	Tranzitorie (vector binar)	1 mg/g LWF
		IL6_KDEL	Tranzitorie (vectori MagnICON)	7,8% TSP
		2G12_KDEL	Tranzitorie (vector viral)	0,12 mg/g LFW
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Semințe	hGAD67/65mut	Transgenic	4,5 mg/g DSW
		2G12	Transgenic	3,6 mg/g DSW
	Frunze	2G12	Transgenic	0,2% TSP
<i>Zea mays</i> (porumb)	Semințe	2G12	Transgenic	> 0,1 mg/g DSW
<i>Lactuca sativa</i> (salată)	Frunze	NVCP	Tranzitorie (vector viral)	0,2 mg/g LFW
<i>Petunia hybrida</i> (petunie)	Semințe	hGAD67/65mut	Transgenic	0,2 mg/g DSW
<i>Daucus carota</i> (morcov)	Radăcini	hGAD65	Transgenic	0,01%TSP
<i>Chlamidomonas reinhardtii</i>		hGAD65	Transgenic	0,3% TSP
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	Fructe	NVCP	Transgenic	0,16 mg/g masă fruct
<i>Solanum tuberosum</i> (cartof)	Tuberculi	NVCP	Transgenic	0,12 mg/g masă tubercul

Nivelurile cele mai înalte de expresie sunt raportate ca masă de proteină recombinant per unitate de biomasă (LFW – masă proaspătăfrunze; DSW – masă uscată semințe), iar când aceste valori au fost indisponibile s-a folosit procentul din proteinele solubile totale (%TSP).

O altă proteină analizată de Merlin et al. (2014) a fost anticorpii monoclonal 2G12, care acționează ca un agent de neutralizare a HIV-1 și poate controla infecția și preveni infecția *in vivo* prin administrare parenterală sau mucoaselor (ca microbicide) în combinație cu alți anticorpi (2F5 și 4E10, de exemplu). Având în vedere că dozele estimate de anticorpi monoclonali per

pacient ar fi de 7-14 g (din fiecare anticorp) și că numărul de purtători HIV în 2012 în lume era aproximat la 35 milioane persoane, rezultă cererea imensă de anticorpi monoclonali, care nu poate fi acoperită prin metodele convenționale, ci prin intermediul sistemelor de producere a proteinelor recombinant [69]. Unele rezultate de acest gen sunt inserate în tabelele 19 și 20.

Interleukina-6 umană (hIL-6) este o citokină implicată în inducerea fazei de răspuns acut și a inflamației, reglarea răspunsului imun, promovarea diferențierii celulelor B în celule secretoare de imunoglobuline, jucând și rolul de miokine (stimulează procesele de lipoliză și oxidare la nivelul mușchilor). Producerea în exces a acestei citokine și a altor citokine proinflamatoare determină boli cronice ca artrita reumatoidă și ateroscleroza, după cum tulburările de expresie a ei au loc în procese neurodegenerative (cum ar fi boala Alzheimer) sau în boli hiperproliferative. Dezvoltarea unor molecule terapeutice care să controleze activitatea hIL6 (să prevină interacțiunea cu receptorul ei hIL6R) reclamă cantități mari de interleukină-6, care nu pot fi obținute prin metodele, să le spunem, clasice (cultura de limfocite). Soluția pare să fie și în acest caz producerea de hIL6 recombinant. Obținerea ei cu ajutorul celulelor de *E. coli* este costisitoare (cca 10-15 mii euro per mg), de aceea s-au luat în considerare și alte sisteme de producere a hIL6 recombinant, cum ar fi celulele de *P. pastoris*, celulele de insecte infectate de baculovirus, plantele de tutun (Merlin et al., 2014) [69], unele din aceste încercări fiind preluate în tabelele 19 și 20.

În urma acestei meta-analize comparative a producerii celor 4 proteine recombinant în diverse platforme de expresie, Merlin et al. (2014) ajung la o serie de concluzii interesante, între care menționăm. Plantele apar ca fiind cele mai utile sisteme de expresie când se are în vedere:

- a) proteinele farmaceutice necesare în cantități mari (cum ar fi componentii cu efect antimicrobian);
- b) proteinele farmaceutice care trebuie produse rapid, cu răspuns rapid (cum ar fi vaccinurile);
- c) proteinele ce necesită modificări post-tranlaționale complexe (anticorpi, proteine cu structuri glican specifice);
- d) proteinele farmaceutice pentru utilizare orală [69].

Pe lângă cele patru proteine recombinant analizate caz-cu-caz, autorii includ în această categorie (a produșilor ce pot fi obținuți cu randament ridicat folosind ca sistem de expresie plantele) și vaccinurile împotriva unor tulpini de sezon ale virusurilor (cum ar fi cazul proteinei hemaglutinina de la tulpina de

influenza H3N2), vaccinurile personalizate (cum ar fi vaccinurile limfomului non-Hodgkin pentru pacienți individuali), proteinele ce poartă glicani specifici - ce le sporesc eficacitatea (cum ar fi cerebrosidaza umană pentru terapia de înlocuire enzimatică). Autorii studiului consideră că una dintre concluziile cele mai importante ale analizei de la caz- la caz efectuate este înalta productivitate a plantelor comparativ cu alte platforme, atunci când se ia în calcul atât cantitatea intrinsecă (per unitatea de biomasă), cât și cantitatea de biomasă (per hectar per an), (Merlin et al., 2014) [69].

5. Valorificarea organismelor modificate genetic și a produselor lor

Este dificil de estimat costurile de producție ale proteinelor recombinant, obținute în diferite sisteme de expresie. Și totuși, unii autori apreciază că producerea pe scară largă a acestor proteine necesită, în cazul celulelor de mamifere, un bioreactor de 10.000 de litri, o perioadă de 3-5 ani și un cost estimat la cca 250-500 milioane dolari, în timp ce o fermă transgenică - cu o singură facilitate de purificare ar realiza aceeași performanță la un cost mult mai scăzut, de cca 80 de milioane dolari (Dyck et al., 2003 – citați de Wang et al., 2013) [113].

Nu am dispus de date foarte recente, dar pentru a ne face o idee (edificatoare, credem noi) asupra impactului proteinelor terapeutice recombinant pe piața de profil, prezentăm în tabelul 21 un top 10 al celor mai comercializate proteine în 2003:

Tabel nr. 21 - Top 10 al celor mai vândute proteine recombinant în 2003
(după Panda, 2008) [76]

Produsul (generic)	Compania	Dolari (miliarde)
Procrit (epoetină alfa, eritropoietină)	Johnson și Johnson	3,986
Epogen (epoetină alfa, eritropoietină)	Amgen	2,435
Neupogen (filgrastim, CMCSF)	Amgen	1,268
Neulasta (pegfilgrastim, Peg-GMCSF)	Amgen	1,255
Novolin (insulină sistemică)	Novo Nordisk	2,235
Avonex (interferon beta-1a)	Biogen IDEC	1,170
PEG-Intron A (interferon alfa pegilat)	Schering Plough	1,851
Enbrel (Etanercept)	Amgen	1,300
Aranesp (darbepoietină alfa)	Amgen	1,544
NeoRecormon (epoetină- beta)	Roche	1,318
Top 10 produse vândute		18,362
Piața totală a proteinelor recombinant		32,065

În 2006 se comercializau 72 de produși recombinant farmaceutici, a căror piață de vânzări era estimată la 47,4 miliarde dolari. Portofoliul acestor proteine era format din 4 tipuri de produși: factori de creștere, interferoni, hormoni și interleukine (Mahmoud, 2007) [63]. Într-o lucrare mai recentă, Mattanovich et al. (2012) [66] arătau că piața globală de proteine recombinant farmaceutice atinsese în 2008 nivelul de 87 miliarde de dolari și era așteptată să ajungă în 2014 la un nivel de 169 miliarde dolari (iar după Zerek și Rozga, 2012 - la 158,2 miliarde dolari în 2015) [125]. Din cei 151 produși care erau aprobați în ianuarie 2009 în SUA și UE, contribuția cea mai mare o aveau 29 de anticorpi monoclonali (cu peste 40%), apoi vaccinurile, blocanții TNF, hormoni ca insulinele și eritropoietinele. Cca 20% dintre aceste proteine recombinant erau produse de celulele de drojdii, 30% în bacilul colic, și 50% în celulele eucariotelor superioare (în special celulele de mamifere și hibridoma).

Potrivit informațiilor sintetizate de Lemaux (2009), estimări de acest gen există și în legătură cu producerea și reglementarea plantelor MG. Astfel, costurile de conformitate pentru producerea de porumb Bt au fost apreciate între 7,1 și 15,4 milioane dolari, iar pentru porumbul HT (rezistent la erbicide) s-a ridicat între 6,1 și 14,5 milioane dolari, care se adaugă la cele de cercetare, dezvoltare, proprietate intelectuală, costuri de transfer ale tehnologiei [55]. În multe țări culturile MG și produsele obținute pe seama lor sunt considerate alimente noi și de aceea au propriile instituții și legislație privind reglementarea importului, cultivării sau utilizării culturilor sau produselor MG, fapt ce duce, pe de o parte, la întâzieri în aprobarea acestora, iar pe de altă parte, contribuie la o creștere evidentă a costurilor. Pray et al. (citați de Qaim, 2009) [83] arătau că o întâziere cu doi ani a aprobării cultivării bumbacului Bt în India a determinat pierderi totale pentru fermieri estimate la peste 100 milioane dolari.

Cheltuielile cu producerea, verificarea, aprobarea și comercializarea culturilor MG sunt mari și necesită resurse financiare importante și de aceea, poate nu surprinde faptul că 80% din caracterele plantelor MG din lume, care au primit aprobare și reglementare, aparțin sau co-aparțin la doar 4 mari companii biotehnologice și sucursale ale acestora – Bayer Cropscience (Monheim am Rhein, Germania), Dupont (Wilmington, Delaware, SUA), Monsanto (St. Louis, Missouri, SUA) și Syngenta (Basel, Elveția). Este de menționat și faptul că, în ciuda numărului mare de caractere transferate la o serie de plante de cultură, cele mai multe culturi comercializate prezintă doar caracterele Bt și/sau HT.

Avantajetehnologiilor OMG ar fi, printre altele, următoarele:

- se pot dezvolta culturi de plante cu recolte ridicate, care au nevoie de mai puțini fertilizatori, de mai puține pesticide, care pot fi calitativ superioare etc;
- dacă în ameliorarea clasică selecția și promovarea unui caracter dorit poate dura multe generații, prin transgeneză un genotip poate fi obținut chiar în generația curentă;
- transgeneza este o tehnică mai predictibilă, în sensul că sunt transferate doar gene sau blocuri de gene și nu mii de gene de la fiecare părinte (ca în ameliorarea tradițională);
- alimentele ce conțin produse OMG par să fie sigure (ele au fost aprobate pentru consum în SUA din 1995 și până în prezent nu s-au înregistrat probleme de sănătate) etc.

Tehnologia de obținere a culturilor MG a fost una dintre cele mai rapid adoptate în agricultură, înregistrând o creștere incredibilă (de 87 de ori) într-un interval de timp scurt, 1996-2010 (James, citat de Amin et al., 2013) [4]. În 1995 primeau aprobare în SUA următoarele culturi MG: rapița cu o compoziție modificată a uleiului (compania Calgene), porumbul Bt (Ciba-Geigy), bumbacul rezistent la bromoxynil (Calgene), bumbacul Bt (Monsanto), cartoful Bt (Monsanto), soia rezistentă la glyfosat (Monsanto), dovleacul rezistent la virusuri (Monsanto-Asgrow) și tomatele cu maturare întârziată (DNAP, Zeneca/Peto, Monsanto) [128]. Primele culturi MG (bumbacul și porumbul Bt) au fost realizate în SUA în 1996 [135].

Patru dintre culturile MG importante – porumbul, soia, bumbacul și rapița, ocupau în 2010, în 29 de țări cultivate, cca 150 milioane de hectare. În 2012, suprafețele destinate culturilor MG erau estimate la 170 milioane hectare, reprezentând cca 12% din suprafața arabilă a globului, ceea ce nu e puțin, având în vedere intervalul scurt de timp ce s-a scurs de la primele astfel de culturi, (Bisht, 2013) [9]. Anterior arătam că în SUA, de exemplu, în 1995 erau comercializate primele culturi MG de soia rezistentă la erbicide (HT), pentru ca un an mai târziu aceste culturi de soia să ocupe 7%, iar în 2008 – 92% din suprafața cultivată cu această plantă în SUA. Ca urmare a adoptării culturilor Bt și HT de bumbac, porumb și soia, în perioada 1996-2002 s-a înregistrat și o reducere importantă a cantității de pesticide (erbicide + insecticide) folosite în SUA (cu 2,5 miln. livre substanță activă), (Lemaux, 2009) [55].

Tabel nr. 22 - Efecte agronomice și economice ale culturilor Bt
(după Qaim, 2009)[83]

Țara	Reducere insecticide (%)	Creștere a recoltei efective (%)	Creștere venituri (\$ US/ha)	Referințe

Bumbac Bt				
Argentina	47	33	23	Qaim and Janwri, 2003, 2005
Australia	48	0	66	Fitt, 2003
China	65	24	470	Pray et al., 2002
India	41	37	135	Qaim et al., 2006; Sadashivappa and Qaim, 2009
Mexic	77	9	295	Traxler et al., 2003
Africa de Sud	33	22	91	Thirtle et al., 2003; Gouse et al., 2004
SUA	36	10	58	Falck-Zepeda et al., 2000; Carpenter et al., 2002
Porumb Bt				
Argentina	0	9	20	Brookes and Barfoot, 2005
Filipine	5	34	53	Brookes and Barfoot, 2005; Yorobe and Quicoy, 2006
Africa de Sud	10	11	42	Brookes and Barfoot, 2005; Gouse et al., 2006
Spania	63	6	70	Gomez-Barbero et al., 2008
SUA	8	5	12	Naseem and Pray, 2004; Fernandez-Cornejo and Li, 2005

În tabelul 22 redăm unele date privind efectele (avantajele) economice ale cultivării bumbacului Bt și porumbului Bt într-o serie de țări ale lumii. Din examinarea lui se poate deduce că în cazul culturilor de bumbac Bt se asigură, funcție de condițiile din țara cultivatoare, reduceri ale insecticidelor utilizate de 33-77%, creșteri de recoltă care pot ajunge până la 37% și venituri nete care pot atinge 470 \$/ha. În cazul culturilor cu porumb Bt, chiar dacă valorile înregistrate de indicii analizați sunt mai modeste, ele nu sunt de neglijat pentru unele țări.

Din 1999, cca 50% din porumbul, bumbacul și soia cultivate în SUA au fost MG. Culturile cu plante MG erau răspândite la sfârșitul lui 2010 în 29 de țări și ocupau o suprafață de 9,8 milioane km² (SUA situându-se în acest sens pe primul loc) [136]. Aceste culturi MG, cum s-a precizat deja, aparțin în mare parte la plante manipulate genetic pentru rezistența la dăunători (Bt) și toleranța la erbicide.

În SUA, culturile cu porumb, soia și bumbac sunt modificate genetic, în special pentru:

- rezistență la erbicidul glyfosat (Roundup Ready), fapt ce permite stropirea culturilor cu soluții de glyfosat pentru distrugerea buruienilor;
- rezistență la atacul insectelor dăunătoare (prin exprimarea toxinei Bt).

În 2013, cca 85% din culturile de porumb, 91% din cele de soia și 88% din cele de bumbac din SUA erau modificate genetic [128]. Țările care au adoptat în procente ridicate culturile MG erau în 2013: Argentina (77%), Brazilia (65%), SUA (42%), Canada (21%), India (6%), (Weise, 2014) [116]. Bumbacul MG era cultivat în 2011 pe o suprafață de cca 25 milioane hectare. În India, de la 50.000 ha cultivate cu bumbac MG în 2002, s-a ajuns la cca 10,6 milioane ha în 2011 [146]. Veniturile fermierilor indieni se ridicau între 2002 și

2011 la 12,6 miliarde de dolari (Bisht, 2013) [9]. Suprafețe importante erau cultivate cu bumbac MG la nivelul anului 2011 și în SUA (4 miln. ha), China (3,9 miln. ha), Pakistan (2,6 miln. ha). Cercetătorii s-au gândit în cazul bumbacului și la silențierea genei pentru gosipol (o substanță toxică), pentru ca în acest fel să poată fi folosite și semințele în alimentație [146].

Și la cartof s-au produs o serie de varietăți MG, cum ar fi ”*New Leaf*” (deținut de Compania Monsanto) – rezistent la gândacul de Colorado, s-au dezvoltat apoi unele varietăți rezistente la virusuri (”*New Leaf Plus*” și *New Leaf Y*”). Compania germană BASF, prin folosirea tehnicii ARN-antisens (pentru blocarea sintezei de amiloză), a obținut cartoful ”*Amflora*”, care conține practic numai amilopectină, ceea ce îl face util în industria de amidon. Cercetătorii indieni au reușit în 2010 să realizeze un cartof MG ce conține cu 35-60% mai multă proteină și o recoltă de tuberculi cu 15-25% mai mare, prin transferul genei *AmAI* de la amarant [145]. Deși cartoful este o plantă alimentară importantă și frecvent folosită în experiențele de transgeneză, nu există încă pe piață cartof transgenic pentru consum uman [128], fiind poate și aceasta o dovadă în plus a responsabilității asumate de organizațiile ce se ocupă de reglementarea și valorificarea pe piață a produselor MG.

Citând o serie de autori, Qaim (2009) [83] arăta că încă la sfârșitul anilor 1990 culturile de bumbac Bt aduceau în SUA câștiguri în plus anuale estimate la 164 milioane dolari, iar în China la 140 miln. dolari. De altfel, doar adoptarea culturilor Bt de bumbac aduc anual venituri estimate la nivel global la 0,7-1,8 miliarde dolari. Pentru porumbul Bt acest surplus în veniturile anuale erau evaluate la 334 miln. dolari în 2001, iar pentru soia HT, câștigurile anuale (în plus) realizate la nivel mondial la sfârșitul anilor 1990 erau estimate la 1 miliard de dolari. Aceste câștiguri au revenit, funcție de țara cultivatoare, în proporții diferite, fermierilor, companiilor inovative (o bună parte), dar și consumatorilor.

Pentru culturile MG de orez (Bt, HT și toleranță la secetă) câștigurile în plus estimate global la nivelul anului 2005 erau de 2,1-2,5 miliarde dolari/an. Din aceeași sinteză a lui Qaim (2009) rezultă că o ante-analiză efectuată de Stein et al. (2008) arăta că orezul MG - *Golden Rice*, ar putea reduce costurile cu deficiența în vitamina A din India cu până la 60% iar, prin modelare, Anderson et al. (2005) au ajuns la concluzia că la nivel global beneficiile de pe urma cultivării ”orezului de aur” (inclusiv în sănătate) ar putea să atingă peste 15 miliarde de dolari (în China, de exemplu, este așteptat să contribuie cu o creștere a venitului național de 2%) [83].

Unele studii arată că americanii sunt mai deschiși spre folosirea ingineriei genetice decât europenii (Amin et al., 2013) [4]. Uniunea Europeană a aprobat cultivarea în statele membre doar a câtorva varietăți de porumb MG. Totuși, produsele alimentare importate în UE pot conține ingrediente MG, dacă acestea nu depășesc 0,9% din produs. În alte state importatoare această toleranță este <1% în Australia și Noua Zeelandă și < 5% în Japonia. Cei mai mari producători de porumb în lume sunt SUA, Argentina, Africa de Sud și Canada – care acoperă 80% din piață, iar Japonia este cel mai mare importator (16,5 milioane tone/an) pentru alimentație și furajarea animalelor (Lemaux, 2009) [55].

În 2009 piața globală de culturi MG (semințe + biotehnologii) era estimată la 10,5 miliarde dolari, din care: porumbul MG – 5,3 mild.; soia MG – 3,9 mild.; rapița MG – 0,3 mild. Piața de semințe transgenice la nivel global este proiectată să progreseze anual cu 12%. SUA, Argentina, Canada și China acopereau în 2006 cca 85% din vânzările de semințe transgenice,[130]. Unele estimări arătau că cca 80% din alimentele procesate în SUA aveau cel puțin un ingredient provenit din culturi MG (Lemaux, 2008) [54].

Un impact pozitiv au avut tehnologiile MG și asupra mediului. Chiar dacă promovarea culturilor HT nu a însemnat în multe situații și reduceri ale cantităților de erbicide folosite, a condus la substituirea cu erbicide mai puțin toxice și cu spectru mai larg, contribuind totodată la reducerea lucrărilor de mobilizare a solului (arăturilor) și implicit la diminuarea eroziunii solului și consumului de combustibili. Pentru culturile Bt beneficiul pentru mediu este dat de reducerea cantității de insecticide aplicate culturilor.

Brookes și Barfoot (citați de Qaim, 2009) [83] au estimat că în perioada 1996-2006 bumbacul Bt a asigurat o reducere de 128.000 tone de insecticide substanță activă, ceea ce a reprezentat un impact mai redus al pesticidelor asupra mediului cu 25%. Ubalua (2009) [107] arăta că, potrivit evaluărilor unor autori, impactul culturilor MG asupra mediului în perioada 1996-2004 a fost o reducere a pesticidelor utilizate de fermieri cu 172.000 tone și a emisiei de gaze de seră cu 10 milioane tone (echivalentul eliminării din circulație a cca 5 milioane de autovehicule/an).

6. Reglementarea organismelor și culturilor MG, marcarea produselor MG

Încă de la reușita din 1972 (Jackson et al., 1972) [42], care a pus bazele tehnologiei ADN recombinant - prin unirea genomului de la virusul SV40 cu cel

de la bacteriofagul λ și operonul pentru galactoză de la *Escherichia coli* și obținerea unui ADN hibrid, Paul Berg devenise conștient că o asemenea tehnologie poate fi o armă cu două tăișuri în mâna omului. În 1974, un grup de cercetători, între care și P. Berg, au solicitat - printr-o scrisoare adresată Președintelui Academiei Naționale de Științe din SUA, constituirea unui Comitet (care s-a numit Comitetul pentru molecule ADN recombinant) care să analizeze problemele de biosiguranță presupuse de această nouă tehnologie. Comitetul s-a întrunit în 1974 și a hotărât că se impunea convocarea unei conferințe internaționale ”*pentru stabilirea unui moratoriu voluntar asupra experiențelor cu ADNr*”, după cum afirma însuși Berg (2004) [8]. Conferința a avut loc la Centrul de Conferințe Asilomar (Monterey, California, SUA) în februarie 1975 și la lucrările ei au participat cca 140 de specialiști (biologi, medici, biochimisti etc) din toată lumea, juriști, reprezentanți guvernamentali și ai presei [141]. Deși opiniile prezentate în conferință au fost diverse și uneori contradictorii, participanții au căzut de acord că este necesar ca cercetările în domeniul ADNr să se desfășoare după reguli precise și stricte. S-au stabilit atunci liniile directoare privind acest gen de experiențe, precum și o serie de recomandări privind amenajarea și dotarea obligatorie a laboratoarelor de profil (pe niveluri, funcție de gradul de risc) pentru asigurarea securității experiențelor cu ADNr.

După conferință au fost critici, cum că pe parcursul ei nu au fost abordate și implicațiile de ordin legal și etic legate de manipularea genetică a plantelor și animalelor. Potrivit spuselor lui Berg (2004), ”*existau (atunci, în 1975, n.n.) speculații că microbi, normal inofensivi, s-ar putea schimba în patogeni umani, prin introducerea de gene care i-ar face rezistenți la antibioticele disponibile, sau capabili să producă toxine periculoase, sau să-i transforme în agenți ce provoacă cancer*”. Ei bine, tot Berg subliniază că, deși s-au efectuat milioane de experimente cu ADNr (din care multe nici nu puteau fi imaginate în 1975), în cele 3 decenii scurse de la Conferința de la Asilomar, nu s-au înregistrat incidente care să fie atribuite practicării acestei tehnologii. În plus, autorul consideră că momentul 1972 a deschis calea unor descoperiri și performanțe notabile în cercetare, că ”*fără instrumentele tehnologiei ADNr nu ar fi existat secvențierea genomului uman sau a altor genoame*”, (Berg, 2004) [8].

Principiile internaționale de evaluare a riscurilor OMG au în vedere câteva aspecte importante: date tehnice și științifice privitoare la organismul receptor și cel/cele donor, vectorul de transfer, însușirile modificate, metodele de decelare și identificare a OMG, informații despre sensibilitate și siguranță,

despre utilizare, informații în legătură cu zona geografică și locul, condițiile geografice și climatice, impactul prevăzut pentru sănătate al intervenției etc. În 1990, FAO, OMS, UNIDO (Organizația Națiunilor Unite pentru Dezvoltare Industrială), UNEP (Programul pentru Mediu al Națiunilor Unite), plecând de la riscurile posibile de biosiguranță și de mediu ale folosirii biotehnologiilor, au constituit în 1990 un Grup de lucru ad-hoc, menit să elaboreze linii directe practice în acest sens, prin consultare cu experți și cercetători internaționali, grup care în 1991 a emis un Cod voluntar de conduită pentru eliberarea în mediu a organismelor. Acest document a trasat principiile generale și măsurile de adoptat la nivel național, regional și internațional pentru aplicarea în siguranță a biotehnologiilor, și conține toate stadiile de cercetare, dezvoltare, folosire, eliberare în mediu a OMG (plante, animale, microorganismele), dar și a produșilor acestora (Macer, 2003) [61].

Dezvoltarea și eliberarea de OMG (culturi de plante MG și pești MG) ca și a produselor MG sunt așadar supuse unor reglementări guvernamentale foarte stricte. În SUA, de exemplu, țara cea mai puternică și sub acest aspect, în care s-a valorificat din plin tehnologia ADNr, s-au creat numeroase firme biotehnologice cu acest profil, care valorifică sub diverse forme atât tehnologiile create cât și produsele lor, care cultivă pe suprafețe întinse plante MG și câștigă enorm de pe urma acestor tehnologii etc, sarcina aprobării eliberării OMG și folosirii produselor MG revine la 3 organisme naționale: Departamentul pentru Agricultură (USDA), Agenția de Protecție a Mediului (EPA) și Administrația pentru Alimente și Medicamente (FDA), (Whitman, 2000; Snow et al., 2004; Lemaux, 2008) [119, 98, 54].

EPA răspunde de reglementarea problemelor de mediu și de sănătate a omului pe care le ridică substanțele de tipul pesticidelor și toxinelor (categorie în care intră și culturile Bt, culturile MG tolerante la erbicide etc). Această agenție coordonează studiile de risc ale pesticidelor folosite pentru mediu și sănătatea omului, stabilește cantitățile limită în care pot fi aplicate culturilor, dar și nivelul lor în alimente după procesare. Cultivatorii plantelor MG trebuie să aibă o licență eliberată de EPA pentru oricare pesticid. Pentru porumbul Bt, de exemplu, în 2000 EPA le-a cerut fermierilor ca alături de porumbul MG să cultive 20% porumb nemodificat genetic, iar în zonele unde se alătură și bumbacul Bt, porumbul ne-MG să reprezinte până la 50%, strategie menită să prevină dezvoltarea unor insecte rezistente la această toxină, dar să procure și zone de refugiu pentru insectele nevizate a fi distruse (Whitman, 2000) [119].

USDA reglementează culturile modificate genetic care nu intră în competența EPA, cum ar fi culturile rezistente la secetă, boli, cele destinate furajării animalelor, legumele, fructele și semințele ce intră în consumul uman. Departamentul răspunde de pericolul potențial reprezentat de OMG, dacă planta MG nu găzduiește insecte dăunătoare, dacă ea nu este o buruiană dăunătoare, dacă scăpată în câmp deschis nu pune în pericol speciile indigene etc, poate impune carantina în privința unor plante suspecte, poate restricționa importul și exportul cu astfel de plante și chiar poate distruge culturile de plante care nu respectă reglementările sale. Sunt exceptate de la autorizarea USDA plantele MG care îndeplinesc următoarele criterii:

- planta nu reprezintă o buruiană periculoasă;
- gena transferată în planta MG s-a integrat stabil în genomul ei;
- funcția genei transferate este cunoscută și nu provoacă boli plantei;
- planta modificată genetic nu este toxică pentru alte organisme decât cele țintite;
- transgena nu provoacă crearea unor virusuri noi la plante;
- planta MG nu conține material genetic de la agenți patogeni animalii sau umani, (Whitman, 2000) [119].

FDA reglementează produsele farmaceutice, cosmetice și aditivii alimentari. Toate produsele alimentare MG trebuie aprobate de FDA înainte de a fi comercializate. De remarcat faptul că, deși fiecare dintre aceste trei instituții au sarcini bine definite în legătură cu OMG și produsele MG, toate au puterea legală de a elimina de pe piață produse MG atunci când, potrivit unor cercetări, se constată că ridică probleme de securitate pentru consumatori sau pentru mediu (Lemaux, 2008) [54].

Evaluarea riscului organismelor modificate genetic și a produselor acestora are în vedere două componente importante: riscul de mediu și sănătatea omului. În *Protocolul de la Cartagena asupra Biosiguranței*, adoptat în 2000, sunt prezentate etapele ce trebuie parcurse în evaluarea riscului, urmărindu-se caracterele organismelor vii modificate (OVM) care ar putea avea impact negativ asupra biodiversității, asupra mediului în care sunt eliberate și asupra sănătății omului. În acest document se specifică: *"un organism viu modificat înseamnă orice organism ce posedă o nouă combinație a materialului genetic obținută prin folosirea biotehnologiilor moderne. Biotehnologia modernă înseamnă aplicarea fie a tehnicilor in vitro asupra acizilor nucleici, incluzând recombinarea ADN și injectarea directă a acizilor nucleici în celule și organite, fie fuziunea celulelor dincolo de familia taxonomică, care depășește barierele*

fiziologice naturale de reproducere și recombinare și care nu reprezintă tehnicile folosite în selecția și ameliorarea tradițională” (Macer, 2003) [61]. Protocolul de la Cartagena stabilește totodată măsurile de protecție în zonele de transfer al OVM, deplasările trans-frontaliere, impactul acestora, în vederea dezvoltării sustenabile a zonei și a conservării diversității biologice.

În Uniunea Europeană s-au adoptat o serie de directive și reglementări privitoare la OMG: Directiva Consiliului 2001/18/EC – care se referă la eliberarea în mediu a OMG, Reglementarea (EC) nr. 1829/2003 privitoare la alimentele și alimentația cu produse MG și Reglementarea (EC) nr. 1830/2003 privind marcarea și traseul produselor furnizate de OMG. Primele două stipulează evaluarea impactului OMG și a produselor alimentare MG înaintea comercializării, având ca scop securizarea pieței, prezența pe piață doar a OMG și produselor MG sigure pentru om, animale și mediu, (Zainol et al., 2011) [124]. De altfel, în UE s-a introdus în mai 1997 un sistem de clasificare NOVEL-FOOD (Alimente noi), potrivit căruia alimentele MG sunt de două categorii:

a) alimente care reprezintă OMG sau conțin OMG (cum ar fi tomatele, iaurtul);

b) alimente ce conțin produse OMG (cum ar fi ulei, enzime, vitamine din plante MG), (Verma et al., 2011) [110].

Trebuie precizat faptul că fiecare țară, inclusiv România, are propriile ei reglementări referitoare la folosirea OMG și produselor MG, după cum în fiecare țară există o anumită percepție a opiniei publice față de OMG și a riscurilor posibile ale folosirii lor, funcție și de modul cum sunt informați consumatorii de către specialiști și de mijloacele mass-media. Atitudinea unei persoane față de o nouă tehnologie, cum este și cea despre care discutăm aici, depinde și de percepția sa privind beneficiile și riscurile tehnologiei, de valorile sociale împărtășite, de încrederea în instituțiile care reprezintă această tehnologie, de unele considerații morale etc (Amin et al., 2013) [4].

În 1986, Organizația economică pentru cooperare și dezvoltare (OECD) a publicat primul document inter-guvernamental intitulat *”Considerații asupra siguranței ADN recombinant”*, privitor la consecințele folosirii OMG, care recomandă ca riscurile să fie discutate pe baza evaluării *”caz cu caz”*. Reglementările ce vizează culturile și alimentele MG variază de la țară la țară, cele mai mari diferențe fiind între SUA și țările Uniunii Europene. În UE se dau aprobări diferențiate funcție de intenție: cultivare/sau import și prelucrare, fiind restricții mai mari în privința cultivării OMG [133].

Pentru aprobarea unui OMG, sau a unui produs MG, efortul este considerabil, se fac zeci de mii de analize, teste în câmp, teste de siguranță alimentară pe animale etc. Spre exemplu, pentru aprobarea culturilor de soia rezistente la erbicide au fost antrenate 31 de agenții de profil din 17 țări. Prezentăm în tabelul 23 unele din analizele (măsurătorile) la care sunt supuse culturile MG și concluziile extrase de autori după realizarea lor.

Tabel nr. 23 - Studii științifice privind siguranța alimentelor provenite din culturi MG (după Deem - 2013, modificat) [15]

Cultura MG	Caracterul MG	Măsurători/analize	Animale testate	Concluzii	Autorii studiului
Porumb	Toxina Bt	Semne clinice și de comportament neurologic, patologie clinică (hematologie, chimie clinică, coagulare, analiza urinei), masa și volumul organelor și patologia microscopică	Șobolani	Nu există diferențe	MacKenzie et al., 2007
Porumb	Toxina Bt	Câștig în greutate, eficiența consumării hranei, semne clinice de toxicitate, mortalitate, oftalmologie, evaluări neuro-comport., patologie clinică (hematologie, chimie clinică, coagulare, analiza urinei) și patologie (masa și volumul organelor și patologia microscopică)	Șobolani	Nu sunt diferențe	Malley et al., 2007
Porumb	Bt	Greutatea corpului, chimia sângelui și urinei	Șobolani	Mici diferențe în creștere, mici diferențe chimice	Seralini et al., 2007
Porumb	Bt/Roundup		Șobolani	Nu sunt diferențe	Healy et al., 2008
Porumb	Toxina Bt	Greutate corp, consum/ utilizare furaje, chimie clinică, hematologie, greutatea absolută și relativă a organelor	Șobolani	Diferențe minore datorate diferențelor în dieta cu fânuri	He et al., 2009
Porumb	Bt/Roundup	Parametri morfologici, hematologici și biochimici și biomarkeri sensibili de sistem, Leziuni ADN, aberații structural-cromosomale, evaluarea potențialului alergen și efecte imunotoxice	Șobolani	Nu există diferențe	Tutelian et al, 2008, 2009); Tyshenko et al., 2008, 2009)
Porumb	Bt, Roundup Ready	Date sanguine și ale sistemului de organe	Șobolani	Unele efecte secundare dependente de sex și doză, asociate cu toxicitate hepato-renală	De Vendomois et al., 2009
Porumb	Bt, erbicidul amoniu-glufofosinat	Variabilele performanței nutriționale, semne clinice și neuro-comportamentale,	Șobolani	Nu există diferențe	Appenzeller et al., 2009

		oftalmologie și patologie clinică, masă organe, patologie grosieră și microscopică			
Porumb	Roundup Ready și ALS-inhibitor al rezistenței la erbicide	Variabilele performanței nutriționale și variabilele răspunsului toxicologic	Șobolani	Nu sunt diferențe	Appenzeller et al., 2009
Porumb	Toxina Bt	Nu s-au găsit efecte toxice la o doză de 1000 ori doza maximă a toxinei Bt la om	Șoarece	Nu există diferențe	Juberg et al., 2009
Porumb	Bt/Roundup	Tumorigeneză	Șobolani	Mai multe tumori la grupul MG	Seralini et al., 2012
Porumb	Bt	Răspunsuri alergice și imunologice	Pui	Nu există diferențe	Buzoianu et al., 2012
Orez	Bt	Comportam. animal, sporul în greutate, parametri hematologici și biochimici din probe de sânge, masă organe, examinări macroscopice și histopatologice	Șobolani	Nu există diferențe	Schreder et al., 2007
Orez	Alergeni polinici de cedru japonez	Comportam. general, masa corpului, valori hematologice și biochimice ale sângelui	Macac	Nu există diferențe	Domon et al., 2009
Soia	Toxina Bt	Mortalitate, variabile ale performanței de creștere, sau masa carcasei și organelor	Pui	Nu există diferențe	McNaughton et al., 2007
Soia	Roundup Ready și erbicidul sulfoniluree	Sporul masei corpului, hrană-consum/eficiență, semne clinice, mortalitate, oftalmologie, evaluări neuro-comportam., patologie clinică, greutatea organelor, patologie brută și microscopică	Șobolani	Nu există diferențe	Appenzeller et al., 2008
Soia	Roundup Ready și erbicidul sulfoniluree	Mortalitate, variabile ale performanței de creștere, sau masa carcasei și organelor	Pui	Nu există diferențe	McNaughton et al., 2008
Soia	Erbicid, acid oleic mononesaturat	Sporul în greutate, hrană - consum/eficiență, mortalitate, semne clinice de toxicitate, observații oftalmologice, evaluare neuro-comportam., masă organe, patologie anatomică și clinică	Șobolani	Nu există diferențe	Delaney et al., 2008
Soia	Roundup Ready	Structura epiteliului duodenal și a colonului, populații bacteriene coliforme	Șoarece	Nu sunt diferențe de structură și floră. Unele diferențe în mucină	Battistelli et al., 2010

O mare dispută există și în privința *marcării* alimentelor ce conțin produse ale culturilor MG sau ingrediente MG. În general, SUA și Canada nu solicită marcarea produselor ce conțin componenți MG. În SUA, politica FDA față de aceste produse este aceeași ca și pentru produsele convenționale. USFDA solicită totuși marcarea alimentelor MG doar în câteva situații:

- dacă alimentul are proprietăți nutriționale semnificativ diferite decât cel obișnuit;
- dacă el include un alergen la care consumatorii nu se așteaptă să fie prezent (de exemplu, proteine de arahide în produsele de soia);
- dacă alimentul conține un toxic peste limitele acceptate (Byrne, 2010) [11].

Un produs MG trebuie marcat doar când el diferă substanțial de cel convențional (Whitman, 2000) [119]. De exemplu, atât uleiul provenit din soia și rapița MG, cât și produsele ce conțin aceste uleiuri, care au o compoziție schimbată în acizi grași, trebuie marcate, iar companiile producătoare sunt obligate să folosească și alte denumiri ale acestora (Lemaux, 2008) [54].

Țările Uniunii Europene și alte câteva țări (în total 42 țări - în 2012) reclamă marcarea produselor ce conțin componente MG (Deem, 2013) [15]. Marcarea este considerată însă de adepții OMG o atenționare care poate îndepărta cumpărătorul de tehnologia sau produsul respectiv. Sunt situații în care unele alimente sunt marcate de producători doar prin specificarea "produs biotehnologic", fără a se preciza ingredientele MG cu potențial alergen (Ubalua, 2009) [107].

Marcarea obligatorie a alimentelor MG ridică însă o serie de probleme deloc simple. Una dintre acestea ar fi, dacă sunt consumatorii dispuși să suporte costurile acestei inițiative? Alte probleme care apar ar fi ca fabricile de profil să construiască linii separate de procesare pentru produse alimentare MG și non-MG, fermierii să nu amestece - în momentul cultivării, recoltării și comercializării, produse ale culturilor MG și non-MG. În cazul marcării produselor alimentare apare un nou aspect și anume, care să fie limitele acceptabile de contaminare a produselor non-MG cu MG? O altă problemă este și cea a capacității de a decela nivelul de contaminare prin tehnici și metode extrem de sensibile. Nu trebuie neglijat nici aspectul educării publicului cu marcarea alimentelor MG, cine să răspundă de acest aspect și cât de costisitoare poate fi această educație (Whitman, 2000) [119].

Grupurile ecologiste de peste tot și opinia publică din multe țări solicită expres marcarea alimentelor ce conțin produse MG, pentru ca oamenii să fie cei care decid dacă să consume sau nu aceste alimente și nu cei care le produc. Este interesant că în SUA peste 70% din alimente conțin ingrediente de la organisme modificate genetic. Faptul că în dieta americanilor au intrat în ultimii 16 ani produse MG, iar longevitatea lor în această perioadă nu a scăzut, ci dimpotrivă a

crescut, este considerată încă o dovadă că alimentele MG nu au un impact negativ asupra sănătății, (Deem, 2013) [15].

Poate fi doar o impresie eronată a noastră, dar credem că opoziția mai mare și reglementările mai dure impuse în UE culturilor MG și produselor MG nu urmărește doar asigurarea biosiguranței și securității alimentare a propriei populații și a sănătății mediului, ci reprezintă și un soi de ”război” pierdut de țările UE în fața avansului luat la un moment dat de companiile biotehnologice americane, o încercare de micșorare a veniturilor acestor firme (care s-au mișcat mai rapid, au investit enorm în aceste tehnologii și au obținut rezultate și profituri pe măsură), o reacție de frustrare în fața avansului tehnologic al acestora. Ce să înțelegem altfel, că organizațiile și instituțiile americane de reglementare și control al OMG și produselor MG fac ”jocul” companiilor biotehnologice, că sunt mai puțin preocupate, mai indulgente când vine vorba de consecințele practicării acestor tehnologii asupra securității omului și mediului în SUA?! Puțin probabil!

7. Controverse privind impactul culturilor și alimentelor MG asupra sănătății mediului și omului

Folosirea tehnicilor ingineriei genetice în obținerea unor organisme cu caractere noi, dar mai ales utilizarea culturilor de plante MG și alimentelor ce conțin produși ai acestora, au stârnit temeri, numeroase discuții și controverse în rândul activiștilor de mediu, al unor organizații religioase, asociații profesionale și al opiniei publice. Chiar și în rândul unor oficiali guvernamentali a sporit preocuparea în legătură cu alimentele MG și îngrijorarea pentru un fapt îndeobște cunoscut că, firmele de profil urmăresc mai ales creșterea profitului lor și sunt mai puțin interesate de pericolele potențiale ale acestora și de adoptarea unor reglementări adecvate în acest sens. Opinia publică este îngrijorată de eventualele consecințe negative ale culturilor și produselor MG asupra sănătății omului și mediului, al unor probleme de ordin social și etic ridicate, dar în mod curios, acceptă contribuțiile tehnologiilor MG în domeniul farmaceutic, (Qaim, 2009) [83].

Conform unor statistici FAO există o tendință pozitivă în acceptarea, dezvoltarea și răspândirea culturilor MG și în țările în curs de dezvoltare. În același timp, există însă și o presiune continuă a activiștilor anti-OMG, care se bazează pe câteva așa-zise fapte care ar demonstra pericolul la care ne expunem prin promovarea și folosirea lor (Ammann, 2008) [3]:

- cercetători care publică lucrări discutabile, bazate pe protocoale de laborator care nu respectă standardele internaționale, cum e cazul experiențelor Irinei Ermakova (asupra cărora vom reveni mai jos);

- activiști pe site-uri web precum cei de la Greenpeace, care propagă materiale alarmiste precum moartea a 1600 de oi în India, care s-ar fi hrănit cu frunze de bumbac Bt. Deși informația a fost o minciună, dovezile științifice arătând că oile respective au fost victime ale unei infecții, ea a continuat să fie promovată pe internet;

- propaganda unor indivizi neinițiați, fanatici anti-OMG, precum Jeffrey Smith (fost membru ardent al cultului Maharishi, care a pretins că există 500 de studii care demonstrează că meditația transcendențială reduce crima și crește IQ-ul);

- publicații ale unor cercetători care filtrează faptele, prezentând doar o față a problemei și omițând date cruciale. Un exemplu este reprezentat de Ann Myhre și colaboratorii săi, care au publicat o lucrare în care arătau că promotorul 35S (folosit ca enhancer de expresie a transgenelor) ar avea o anumită activitate în culturile de celule umane, dar "au uitat" să precizeze pentru cititori că același promotor este consumat zilnic de cei ce savurează legume din familia *Brassicaceae*, (Ammann, 2008) [3].

Citând o serie de autori care au evaluat eventualele consecințe, directe și indirecte, ale folosirii OMG (în special al culturilor Bt și HT), Garcia și Altieri (2005) [27] arătau că îngrijorările sunt legate de evenimente ca:

- a) răspândirea transgenelor la rude sălbatice sau buruieni;
- b) reducerea sau creșterea fitnessului organismelor ne-țintă (în special varietăți locale sau buruieni) prin achiziția prin hibridare a unor caractere transgenice;
- c) evoluția rezistenței la toxinele Bt a unor insecte dăunătoare (cum ar fi Lepidoptere și Coleoptere);
- d) acumularea în sol a toxinelor Bt care rămân active prin legarea lor la argile și acizi humici;
- e) distrugerea controlului natural al insectelor dăunătoare prin efectele toxinelor Bt asupra dușmanilor naturali;
- f) efecte neașteptate asupra insectelor erbivore ne-țintă;
- g) transferul orizontal de gene mediat de vectori și apariția, prin recombinare, de organisme patogene noi;

h) escaladarea folosirii erbicidelor în culturile HT (rezistente la erbicide) determină consecințe asupra mediului (care includ reducerea diversității și a populațiilor de buruieni);

i) populațiile reduse de buruieni duc la declin în populațiile de păsări ce se hrănesc cu acestea sau cu artropodele întreținute de buruieni;

j) diversitatea redusă a buruienilor conduce la pagube mai mari printre dăunători, din cauza efectului de concentrare a resurselor sau sărăcirii comunităților de dușmani naturali;

k) selecția de buruieni rezistente la erbicide, mai nocive, (Garcia și Altieri, 2005) [27].

Efectele organismelor transgenice asupra mediului sunt controversate și pentru că nu dispunem de modalități eficiente de cuantificare a riscurilor asociate. Este curios că, opinia publică nu-și pune problema eventualelor riscuri pe care le presupune consumul unor produse provenite de la culturile convenționale de plante, dar devine foarte preocupată și suspicioasă atunci când vine vorba de culturile MG. Nu s-au semnalat proteste nici în cazul folosirii unor metode netradiționale de ameliorare a plantelor cum ar fi mutagenza experimentală, culturile de celule *in vitro*, izolarea și fuziunea de protoplaști și obținerea de hibrizi somatici (care nu ar fi putut apărea în natură fără intervenția omului) etc. Așa cum constata Ubalua (2009) [107] citând unii autori, oamenii nu s-au alarmat în cazul uleiului de rapiță provenită de la plante cultivate în Canada, care aveau în genom două gene de rezistență la erbicide, achiziționate prin tehnicile convenționale, dar sunt foarte rezervați când vine vorba de uleiul de rapiță transgenică, după cum nu s-au sesizat nici în cazul cultivării speciei hibride de cereale *Triticale* (provenită din încrucișarea grâului cu secara). Alte exemple de acest gen sunt evocate și de Sorochinskii et al. (2011) [99]: o varietate de țelină rezistentă la pesticide obținută prin metode clasice de ameliorare, care a provocat boli printre fermieri (datorită unui conținut de 7 ori mai ridicat de *psoralen* decât planta obișnuită); varietatea de cartof *Lenape*, ce conținea nivel înalt de *solanină* (toxică), fapt pentru care a fost eliminată din culturi.

Aceasta nu înseamnă, cum am specificat deja, că ar trebui neglijate eventualele riscuri ale OMG asupra mediului care, potrivit unor autori, impune să ținem cont de aspecte ca:

- experiența încă insuficientă asupra caracterelor manipulate genetic și combinării lor la gazdă;

- luarea în calcul a faptului că OMG introduse în mediu pot prolifera și persista fără intervenția omului;
- posibilitatea unor schimburi de material genetic între organismele transgenice și cele de tip sălbatic;
- într-un anumit mediu, caracterul transferat poate să confere avantaje OMG față de specia nativă etc, (Snow et al., (2005) [98].

Autorii citați consideră că trebuie minimalizate efectele ecologice ale OMG.

Procesul de inserție a transgenelor în celule/plante poate da naștere la efecte genetice neintenționate. Mecanismul prin care sunt încorporate genele străine în genomul gazdă este încă insuficient cunoscut. De aceea, se consideră că este teoretic posibil ca inserția lor întâmplătoare să deregleze activitatea altor gene, cu efecte nedorite asupra plantei, (Deem, 2013) [15]. Sunt de asemenea opinii că genele străine încorporate în genomul plantelor ar putea să determine "efecte pleiotropice" (care ar avea o frecvență de cca 30%) și să confere acestora caractere noi. Un astfel de efect pleiotropic ar fi intensificarea competitivității culturilor MG prin eliberarea lor în mediu (Grubinger, 2000) [36].

Tehnicile de bioinginerie dezvoltate recent sunt însă capabile să provoace modificări bine țintite în genomul plantelor (Kuzma și Kokotovich, 2011) [52], să insereze ADN-ul străin în locuri precise din genom, să elimine secvențe nedorite de ADN, sau să producă modificări subtile în genomul plantei (cum ar fi substituția doar a unei baze azotate din ADN-ul genei). Tehnologia *TagMo* (care folosește nucleaze zinc-finger manipulate sau meganucleaze) permite rupturi dublu-catenare ADN în locuri precise din genom, între capetele acestora fiind inserată gena străină. Potențialul imens al tehnologiei constă în faptul că ea permite modificarea genomului plantelor în mod direct și țintit. Prin folosirea acestei tehnologii se pot înlocui unele gene cu altele, dar se și pot schimba doar unele nucleotide într-o genă (pentru a obține un efect dorit) atunci când nu recurgem la transferul de ADN de la altă specie. În acest fel, culturile manipulate genetic prin tehnologia TagMo pot fi de mai multe tipuri:

- cu ADN străin provenit de la specii compatibile și incompatibile sexual;
- fără ADN inserat, dar cu părți din cromosom eliminate sau gene deletate;
- culturi în care este înlocuită o genă cu o versiune schimbată sau cu secvența ei de nucleotide schimbată, (Kuzma și Kokotovich, 2011) [52].

Sunt scenariile privind riscul transferului *pe orizontală* (de la OMG la alte organisme; la bacterii, de exemplu) a unor gene pentru rezistență la erbicide, pesticide, antibiotice etc, care ar pune în pericol nu doar sănătatea omului, ci ar

duce și la dezechilibre ecologice majore. Se știe însă că, deși transferul natural de gene pe orizontală la micro-organisme nu este exclus, este totuși considerat a avea o rată foarte scăzută, iar transferul de gene de la plantele MG la bacterii este și mai puțin probabil, din cauză că la plante genele conțin introni, iar la bacterii, nu). În Europa, de altfel, este interzisă în prezent folosirea de gene marker pentru rezistență la antibiotice la culturile comerciale [127].

Ar exista însă riscuri și mai mari în privința transferului *pe verticală* a unor astfel de gene, care ar putea duce, de exemplu, la apariția de *superburuieni* și respectiv la *supergândaci* (Gertsberg, 2011) [29]. Prin introducerea în cultură a unor plante MG rezistente la erbicide s-ar putea ca transgenele ce le conferă această calitate să fie transferate prin hibridare la unele buruieni, ducând la apariția de *superburuieni*, care vor tolera și ele erbicidele și vor deveni mai invazive și mai periculoase decât buruienile obișnuite (Whitman, 2000) [119]. Deși nu există încă buruieni MG, aceste riscuri nu sunt excluse pentru plantele care au în natură rude sălbatice (cum ar fi porumbul, napul, bumbacul, orezul) și capacitatea de a se poleniza încrucișat cu acestea. Sunt unele dovezi că astfel de încrucișări sunt posibile, cum ar fi cazul între porumb și teosint.

Din acest motiv, trebuie imaginate strategii care să minimalizeze fluxul de gene de la o cultură la alta și dezvoltarea de plante transgenice care să ofere biosiguranță în perspectivă proprie, ceea ce s-ar putea realiza prin:

- evitarea sau minimizarea polenizării încrucișate;
- evitarea antibioticelor ca markeri;
- expresia genelor străine numai în țesuturi specifice și în anumite stadii de dezvoltare (Megha și Kaur, 2013) [67].

Pentru a elimina sau minimaliza fluxul de gene se recomandă instalarea culturilor transgenice în zone unde nu se găsesc rude sălbatice ale plantelor MG compatibile. Se impune de asemenea cultivarea de varietăți HT dotate cu gene de rezistență la erbicide având modalități diferite de acțiune și folosirea lor alternativă prin rotație, ceea ce ar încetini procesul de dezvoltare a rezistenței la buruieni (Lemaux, 2009) [55].

Pentru prevenirea unor situații nedorite, pentru diminuarea riscurilor în cazul eliberării în mediu a unor OMG, Snow et al., făceau în 2005 [98] o serie de recomandări, pe care le considerăm de actualitate și în prezent, chiar dacă de la formularea lor s-a scurs un deceniu:

- *o atenție specială în proiectarea unui OMG*, astfel încât să se reducă riscurile asupra mediului prin încorporarea în OMG a unor gene care pot determina sterilitate, fitnes scăzut, expresia unor gene inductibile mai degrabă

decât a celor constitutive, absența unor markeri selectabili nedoriți (gene pentru rezistență la antibiotice sau la erbicide, care nu trebuie să se regăsească în produsul final). Efectele proteinei toxice Bt, de exemplu, s-ar putea reduce dacă expresia transgenei ar fi controlată de promotori specifici de țesut sau de stadiul de dezvoltare al plantei și nu de promotori constitutivi;

- *analiza beneficiilor și riscurilor de mediu*, ceea ce presupune investigații riguroase și complexe de acest gen, realizate de către biologi, ecologi, evoluționiști și alți specialiști, iar guvernele și sectoarele comerciale să-și extindă suportul pentru evaluarea riscurilor (și beneficiilor) de mediu și managementul riscului [98]. Autorii sumarizează într-un tabel care sunt îngrijorările majore legate de impactul organismelor transgenice asupra mediului (tab. 24).

Tabel nr. 24 - Preocupări (îngrijorări) majore de mediu privind organismele transgenice (după Snow et al., 2005)

Procese (efecte)	Consecințele ecologice potențiale
Organismele transgenice persistă fără a fi cultivate	Organismele transgenice capabile să se răspândească și să păstreze populații care se autosuțin ar putea perturba comunitățile biotice și ecosistemele, conducând la o pierdere a diversității biologice
Organismele transgenice se inter-încrucișează cu taxoni înrudiți	Încorporarea de transgene poate determina o mai mare invazivitate sau pierderea biodiversității, funcție de fluxul de gene de la o generație la alta și de caracterul(ele) transgenice
Fluxul orizontal de gene	Fluxul de gene prin mijloace non-sexuate este obișnuit la unele micro-organisme dar rar la plante și animale. Consecințele ecologice depind de intensitatea fluxului de gene și caracterul(ele) transgenice
Schimbări în bolile virale	La organismele transgenice rezistente la viroze, recombinări între transgenele virale și virusurile invadatoare ar putea duce la creșterea virulenței unei boli și la efecte nedorite asupra gazdelor sălbatice din habitatele naturale
Efecte neîntinse și indirecte	Poate avea loc pierderea biodiversității (care include îngrijorări privind conservarea speciilor), precum și schimbări funcționale ale comunității sau ecosistemului (care includ un control biologic scăzut al dăunătorilor, o reducere a polenizării, circuit alterat al carbonului și azotului în sol și epidemii secundare de dăunători)
Evoluția rezistenței	Rezistența la pesticide (inclusiv a pesticidelor produse de plante) poate duce la o mai mare folosire a substanțelor și altor metode de control al dăunătorilor care pot dăuna mediului. Aceasta se aplică la insecte, buruieni și la alți dăunători

- *prevenirea eliberării în mediu a unor OMG nedorite*. Pentru că, după eliberarea în mediu pe scară largă a unui OMG este mai dificil de intervenit și controlat impactul lui asupra mediului, se impune prevenirea eliberării OMG dacă nu sunt cunoscute temeinic riscurile posibile, sau există informații care sugerează posibilitatea unor serioase efecte nedorite. Este practic imposibil de a preveni fluxul de gene între speciile compatibile sexual. De aceea este important de stabilit tipurile de culturi transgenice ale căror noi caractere ar putea persista

și creea probleme. La fel stau lucrurile și cu fluxul de gene al unor specii de animale acvatice transgenice (pești, crustacei, moluște etc). Scăparea în mediu a unor astfel de organisme transgenice poate fi dăunătoare pentru populațiile conspecifice și pentru alte specii acvatice cu care acestea interacționează (peștii transgenici eliberați în mediu s-ar putea încrucișa cu populațiile naturale și ar putea duce la efecte dificil de anticipat) etc;

- *monitorizarea OMG comerciale*. Este posibil ca prin monitorizarea post-eliberare în mediu a OMG să apară unele riscuri care nu au fost identificate în testările la scară mică, de aceea este necesară o atenție deosebită la apariția oricărei probleme suspecte și luarea de măsuri adecvate și imediate. Deoarece testările în laborator și la scară mică în câmp a OMG nu pot reproduce toate interacțiunile care au loc într-un ecosistem, trebuie monitorizate atent și identificate orice efecte ecologice adverse după eliberarea în ecosistemul dat a unui OMG;

- *considerații privind reglementarea*. O abordare științifică a regulilor care să stea la baza folosirii OMG ar trebui să țină seamă ca toate organismele transgenice să fie supuse unor evaluări similare privind riscurile, că multe riscuri de mediu țin de OMG-ul dat, sunt specifice de loc și de aplicație, iar analiza riscului de mediu să fie abordată cu precauție;

- *instruirea multidisciplinară* privind riscurile OMG de către ecologi, agronomi, biologi moleculariști și alți specialiști, realizarea de instruiți pluridisciplinare și colaborări în cercetări multidisciplinare privind beneficiile OMG și riscurile de mediu implicate [98].

O controversă faimoasă privind efectele OMG s-a ivit în 1999, în legătură cu porumbul Bt. Losey et al. au arătat că polenul de porumb Bt s-ar depune pe frunzele de *Asclepis syriaca* din preajma lanurilor de porumb și ar provoca moartea omizilor fluturelui monarh (*Danaus plexipus*) care se hrănesc cu frunzele acestei plante. Cercetări extinse, efectuate ulterior de către 6 echipe de cercetare complexe, publicate în revista "Nature", au conchis că riscurile porumbului Bt pentru acest fluture sunt "foarte scăzute" (Sears et al., 2001) [91]. Unii specialiști consideră însă că rezultatele acestui studiu sunt discutabile, pentru că ele s-ar fi executat doar în condiții de laborator, nu și în câmp, în condiții naturale. Pe de altă parte, este posibil ca rezultatele studiului să fie valabile în cazul fluturelui amintit, dar toxina Bt omoară fără discriminare larvele multor specii de insecte și este greu de acceptat că poate fi proiectată o toxină Bt selectivă, care să distrugă doar insectele dăunătoare unei anumite

culturi. Sunt observații care au impus reexaminarea acestei probleme de către USDA și Agenția de Protecție a Mediului din SUA, (Whitman, 2000) [119].

S-a invocat de asemenea efectul negativ al culturilor de porumb Bt asupra coloniilor de albine. Și în acest caz s-au efectuat numeroase experiențe pentru a lămurii cum stau lucrurile. O meta-analiză efectuată în 2008 de Duan et al. (citați de Lemaux, 2009) pe 25 de studii independente, care au avut ca obiect tocmai acest aspect, a arătat că proteinele Cry specifice culturilor Bt comercializate pentru controlul lepidopterelor și coleopterelor dăunătoare nu au efecte negative asupra supraviețuirii larvelor și adulților de albine [55]. O sinteză asemănătoare, realizată anterior (în 2007) de Marvier et al. (citați de aceeași autoare) pe baza rezultatelor cercetărilor dintr-o bază de date asupra efectelor culturilor Bt asupra insectelor ne-țintă, care a cuprins 42 de experiențe în câmp și în care s-au luat în considerație locul, durata, dimensiunile parcelelor și probelor, a stabilit că:

- abundența medie a grupelor de nevertebrate ne-țintă (însemnând număr, supraviețuire, creștere) a fost mai mare în câmpurile cu bumbac și porumb Bt decât în câmpurile în care s-au folosit insecticide;
- când s-au comparat câmpurile cu plante Bt cu cele libere de insecticide, unele insecte ne-țintă au fost mai abundente în câmpurile Bt.

Și Carpenter (2011) [13] arăta că studii efectuate în câmp au relevat că abundența și activitatea paraziților și prădătorilor sunt similare în culturile Bt și non-Bt. O evaluare la nivel de fermă în Arizona în culturi Bt de bumbac a evidențiat efecte negative asupra diversității furnicilor și pozitive asupra diversității gândacilor, constatându-se că impactul culturilor MG nu a fost mai mare decât al culturilor convenționale de bumbac (Cattaneo et al., 2006 – citați de Park et al., 2010) [77]. Folosirea îndelungată a culturilor transgenice Bt într-o zonă ar putea determina însă acumularea în sol (prin încorporarea materialului foliar) a toxinelor Bt, toxine care ar putea rezista degradării, prin legarea lor la particulele de argile sau la acizii humici, menținându-le astfel active (Gertsberg, 2011) [29]. Pe de altă parte, numeroase publicații au arătat că porumbul Bt, spre exemplu, este mai sănătos decât cel cultivat în mod obișnuit, pentru că conține mai puține micotoxine (care sunt considerate cancerigene), (Ammann, 2008) [3].

Adeptii plantelor de cultură MG consideră că prin cultivarea lor s-a produs o reducere a folosirii insecticidelor și s-a reușit manipularea erbicidelor în raport cu mediul într-un mod mai prietenos. Culturile transgenice ar reduce eroziunea solului, folosirea pesticidelor și operațiile asociate cu stropirea repetată a culturilor cu pesticide, fapt ce ar conduce inclusiv la reducerea gazelor de seră emise (Park et al., 2010) [77].

Operațiunile de transgeneză la plante deschid perspective interesante și sub alte aspecte. Potrivit informațiilor sintetizate de Carpenter (2011) [13], obținerea de culturi tolerante la secetă și salinitate ar putea asigura valorificarea de noi terenuri pentru agricultură. Culturile rezistente la secetă ar fi relevante pentru zone precum Africa sub-sahariană, unde uscăciunea este un fapt obișnuit, iar accesul la irigare este limitat. Un impact deosebit va avea transferul genelor fixatoare de azot (de la unele leguminoase la alte plante de cultură, în special la cereale), realizare care ar asigura reducerea fertilizării cu azot și a prezenței acestor îngrășăminte în apele de suprafață. Sunt tehnologii care ar putea deveni într-o bună zi comerciale.

Pentru a evita riscurile culturilor Bt asupra unor insecte utile, sau dezvoltarea unor insecte rezistente la această toxină, s-au întrevăzut și anumite soluții. Răspândirea unor astfel de transgene prin intermediul polenului (de la specii alogame MG la specii de plante ne-țintă) ar putea fi împiedicată prin obținerea de plante MG mascul sterile. O altă strategie (amintită într-un capitol anterior) ar fi crearea de zone tampon în jurul loturilor cu plante MG. Spre exemplu, culturile cu porumb Bt pot fi înconjurate de o zonă tampon (cu o lățime de 6 până la 30 m, sau chiar mai mult) în care se cultivă porumb obișnuit, care nu va fi recoltat, dar care va reprezenta un spațiu de refugiu pentru dezvoltarea insectelor utile și dăunătoare. În acest fel ar fi limitată și răspândirea de către vânt a polenului MG dincolo de zona tampon (Whitman, 2000) [119].

Un alt risc invocat de inamicii culturilor MG, ar fi acela că ele ar atenta la conservarea biodiversității. Pentru a face aprecieri de această natură, Carpenter (2011) [13] consideră că ar trebui să luăm în considerație însuși impactul agriculturii asupra biodiversității, care este evident unul negativ, pentru că sunt convertite ecosisteme naturale în terenuri agricole. Organizația pentru Alimente și Agricultură a Națiunilor Unite apreciază că din 1900, când fermierii au trecut la cultivarea de varietăți de cultură uniforme genetic, s-a pierdut cca 75% din diversitatea genetică a plantelor (Gertsberg, 2011) [29].

Când discutăm despre riscurile culturilor MG asupra mediului în general, ar trebui poate să analizăm și evaluăm corect și consecințele așa-zisei ”revoluții verzi” pentru sistemele agricole. Pentru creșterea producției agricole au fost promovate la un moment dat, pe scară largă, varietăți de cultură super-productive (care să răspundă inputurilor), s-a trecut la utilizarea intensă și masivă a fertilizatorilor, pesticidelor, la dezvoltarea sistemului de irigații etc. A fost acest sistem prietenos cu mediul ?! Cu siguranță că nu a fost. Se putea altfel? Un răspuns categoric este dificil de dat, în condițiile în care necesarul de

produse agro-alimentare a fost în continuă creștere, ca urmare a creșterii continue a populației globului. Sunt situații, cum este și aceasta, în care nu prea ai de ales. Pe de altă parte, dacă marii fermieri nu ar urmări cu orice preț câștigurile, profitul cât mai mare, probabil că și agricultura ar avea un impact mai scăzut asupra mediului.

Sunt autori care compară cultivarea plantelor MG cu introducerea unor specii într-un mediu nou și consideră că o specie odată introdusă într-un nou ecosistem este dificil (dacă nu imposibil) de eliminat din acel ecosistem, din cauza particularităților ei de creștere, dezvoltare, reproducere, răspândire etc. În SUA, 128 de specii de cultură introduse au devenit buruieni redutabile (Pimentel et al., 1989 – citați de Peterson et al., 2000) [79]. Noi considerăm exagerată această comparație între o specie introdusă și culturile de plante MG. O specie introdusă într-un nou habitat vine cu un arsenal imens de gene comparativ cu o plantă de cultură MG (care diferă de cea din care a derivat doar prin una sau câteva transgene), poate avea o altă normă de reacție și deveni extrem de competitivă (nefiind amenințată de boli și dăunători specifici). În plus, culturile MG depind de anumite lucrări de întreținere specifice, pot fi manipulate genetic pentru a deveni sterile, sau pentru a avea o capacitate scăzută de răspândire etc, aspecte care nu se iau în calcul în cazul unei specii nou introduse.

De altfel, Frankel (citată de Lemaux, 2009) [55] stabilește unele principii ale eroziunii genetice, când discută impactul agriculturii asupra biodiversității, și anume:

a) în timpul agriculturii pre-moderne, speciile cultivate erau stabile în centrele de diversitate;

b) agricultura modernă, care a inclus noi varietăți de cultură, a produs instabilitate;

c) competiția între varietățile locale și cele introduse a dus la dislocarea celor locale;

d) prin dislocarea varietăților locale a fost erodată variabilitatea genetică a populațiilor cultivate.

De evaluat sau prezis impactul pe termen lung al folosirii plantelor MG asupra agro-bio-diversității este o misiune extrem de dificilă. După unii autori culturile MG pot fie degrada, fie îmbunătăți funcționarea agro-ecosistemelor, aceste efecte depinzând de culturile MG promovate și de cum sunt ele folosite (Peterson et al., 2000) [79]. Culturile cu plante transgenice nu ocupă terenuri noi, ci se realizează pe aceleași terenuri cu cele clasice. Ar fi necesar să evaluăm

plusul de "presiune" pe care îl exercită acestea asupra agro-biocenozelor ceea ce, trebuie să recunoaștem, nu e deloc simplu. De altfel, unii autori (Dale et al., 2002; Sanvido et al., 2007 – citați de Carpenter, 2011) [13] sunt de părere că culturile MG au impact scăzut și nu neaparat negativ asupra mediului, alți autori (Gianessi et al., 2002; Dale et al., 2002 - citați de același autor) apreciază că impactul culturilor MG este similar cu al culturilor non-MG, după cum sunt și autori care consideră că aceste culturi pot avea chiar un impact pozitiv în combaterea eroziunii solului (în anumite zone), în reducerea încărcăturii cu pesticide în sol și apă. Sunt informații tot mai numeroase, de exemplu, că promovarea culturilor de plante rezistente la erbicide au permis adoptarea de noi practici de control al buruienilor, de conservare a terenurilor și au asigurat dezvoltarea de soluții "no-till" (fără întoarcerea solului prin arat), (Ammann, 2008) [3].

În multe situații, arată Park et al. (2010) [77], nu atât natura plantelor cultivate (transgenică sau nu) influențează biodiversitatea, ci mai degrabă managementul sistemelor agricole. Unele predicții realizate prin modelare matematică arată că prin cultivarea plantelor MG rezistente la erbicide (HT) sunt afectate diversitatea și numărul unor organisme cum ar fi microorganisme, prădători, păsări, viespi parazite, care au rol important în controlul unor dăunători și boli. Cuantificarea acestor efecte în diverse culturi HT, într-un studiu amplu realizat în Marea Britanie, a arătat că ele difereau funcție de cultura în cauză, iar diferențele înregistrate nu au fost datorate atât faptului că aceste culturi erau MG, cât varietăților cultivate (Lemaux, 2009) [55].

Se consideră că monoculturile la scară mare, ce rezultă din cultivarea plantelor MG, promovează uniformitatea (Gertsberg, 2011) [29], ceea ce ar acutiza unele probleme de mediu, iar instalarea acestor culturi în țările în curs de dezvoltare din zonele tropicale ar periclita centrele de biodiversitate (Kathen, 1996 – citat de Garcia și Altieri, 2005) [27]. Practicarea monoculturii (cum este și cazul culturilor de plante MG), are inconveniente demonstrate deja în culturile (mono) convenționale și anume: vulnerabilitatea în cazul atacului unui nou dăunător sau agent patogen și o pierdere a diversității genetice. Există totodată temerea că terenurile cultivate cu plante MG ar putea deveni un soi de "deșerturi biologice", care ar împiedica "deplasarea" populațiilor spontane de plante și animale.

Nu sunt puține vocile care fac apel la aplicarea de metode multiple de evaluare a impactului OMG asupra structurii și funcțiilor unui ecosistem. Pentru că în acest caz nu avem de-a face cu certitudini, este nevoie de multă prudență și

de aceea se consideră că în legătură cu eventualele pagube aduse mediului de către OMG se impune mai degrabă folosirea criteriului ”dovezi ale absenței” consecințelor, decât a criteriului ”absența de dovezi” (Garcia și Altieri, 2005) [27]. Efectele potențiale ale culturilor transgenice asupra mediului prezintă unele riscuri ca:

- pagube serioase aduse mediului din cauza presiunilor ce se acumulează, care ar declanșa efecte de prag (cum ar fi epuizarea populațiilor unor organisme ne-țintă);

- fără o cunoaștere atentă și o monitorizare îmbunătățită, beneficiile potențiale ale unor plante transgenice asupra mediului pot fi subestimate, ducând la restricții neadecvate pentru această tehnologie;

- nu va putea fi pe deplin exploatat potențialul pe termen lung al culturilor transgenice sau al unor tehnologii agricole alternative de a reduce sau rezolva problemele naturale ale mediului (Ervin et al., 2003 – citați de Megha și Kaur, 2013) [67].

Cum am prezentat deja, nu sunt dovezi foarte concrete privind eventualele efecte negative asupra mediului provocate de culturile transgenice. Că lucrurile stau astfel, vine să confirme o concluzie relativ recentă (2010) a Consiliul Național de Cercetare din Statele Unite, conform căreia ”*în general, culturile MG au avut mai puține efecte adverse asupra mediului decât culturile non-MG produse convențional*” (Carpenter, 2011) [13]. Credem că este totuși prea devreme să ne pronunțăm în acest fel și atât de categoric în privința impactului culturilor MG asupra sănătății mediului și omului, chiar dacă au trecut două decenii de la promovarea lor.

Cum arătam și anterior, în cazul culturilor transgenice, specialiștii s-au gândit la soluții pentru limitarea răspândirii transgenelor în mediu, cum ar fi: expresia acestor gene doar în organe și țesuturi specifice, exprimarea lor doar în momentul când sunt necesare proteinele recombinant, eliminarea excesului de ADN străin din plantele transgenice (a markerilor selectivi), limitarea riscurilor fluxului de gene, prin polenizarea încrucișată, la alte plante etc.

În acest din urmă caz există preocupări pentru a elimina transgenele din polen și una dintre metodele de a pune în practică această idee este de a insera transgenele în cloroplaste și nu în nucleu (cum se practică de regulă). Întrucât genele specifice cloroplastelor se transmit pe linie maternă, transgenele nu se vor mai exprima în polen și astfel se evită și dispersia lor nedorită (Jube și Borthacur, 2007) [46]. Cum se știe, genele în plastide sunt organizate ca la procariote (în operoni). Transgenele se inserează în genomul plastidial prin

recombinare omoloagă și de aceea expresia lor va fi mult mai stabilă și predictibilă decât prin inserarea lor în nucleul celulelor vegetale (unde nivelul de expresie este mai scăzut, iar inserția genei este întâmplătoare pe cromosomi și de aici posibilitatea ca gena să nu se exprime din cauza ”efectului de poziție”). Cloroplastul permite totodată inserarea mai multor transgene și punerea lor sub controlul unui singur promotor, asigurând astfel o expresie coordonată a acestor gene. În plantele trans-plastomice, crește considerabil expresia proteinelor recombinant datorită prezenței unui număr foarte mare de plastide în celulă [46].

Unii autori consideră că înainte de a se accepta folosirea pe scară largă a cercetărilor de inginerie genetică și a animalelor transgenice trebuie avute în vedere o serie de aspecte ca:

- beneficiile și riscurile folosirii experimentale a animalelor;
- riscurile de a declanșa boli noi (pentru care nu există tratament), prin combinarea ADN provenit de la animale, plante și om;
- riscuri posibile asupra mediului pe termen lung;
- posibilitatea creșterii suferinței organismelor transgenice. Activiști de mediu și pentru drepturile animalelor, specialiști în bioetică sunt de părere că este greșit să obținem, prin schimbări genetice, animale care suferă (cum ar fi de exemplu, porci lipsiți de picioare) și că aceste experiențe ar trebui interzise (Annas et al., 2002 – citați de MacDonald Glenn, 2013) [60].

Disputele dintre adepții și oponenții manipulărilor genetice la animale și om merg uneori prea departe. Cum se întâmplă adeseori, și în acest caz, al folosirii tehnicilor de inginerie genetică putem asista la unele abuzuri, dar speculații de genul că s-ar putea crea forme de viață ce conțin material genetic de la ființe diferite (de la maimuțe și om, de exemplu) - care ar pune însăși problema definirii lor legale și etice, sau că prin aceste tehnici s-ar putea crea ”superoameni” etc (MacDonald Glenn, 2013) [60], sunt exagerate și par mai degrabă de domeniul ficțiunii.

Tehnologia de transgeneză este contestată de unii și din cauza riscului de a altera ecosistemele. Un exemplu: somonul transgenic (care are o rată de creștere de 2 ori mai mare decât cel nativ), ar putea să scape accidental din fermele de creștere, să invadeze ecosistemele naturale și să concureze somonul nativ pentru hrană, spațiu, împerechere etc [129].

Unii oponenți ai OMG (în special activiștii de mediu) invocă și argumente de ordin etic, faptul că genotipuri de acest fel nu ar fi putut apare pe cale naturală, că unele animale sunt modificate genetic în interesul omului, ceea ce ar reprezenta o manipulare a vieții și o violare a drepturilor naturale ale speciilor

[126]. Din păcate chiar unele din aceste grupuri se comportă ne-etic. În 1999, de exemplu, activiștii de mediu au distrus o plantație de plopi MG lângă Londra (care avea ca obiectiv tocmai verificarea unora din solicitările ecologiștilor), iar în 2000 - în SUA, grupuri de indivizi ce se opun alimentelor MG au vandalizat laboratoare și au distrus culturi de câmp cu plante ne-transgenice [129].

S-a invocat posibilitatea ca dăunătorii specifici culturilor Bt să dezvolte în timp rezistență la toxina Bt și deci culturile transgenice pentru această toxină să nu mai fie protejate. Acest posibil fenomen a fost anticipat și pentru a fi contracarat, culturile transgenice au fost ”dotate” cu variante ale acestei proteine toxice. O altă problemă ridicată a fost și aceea, dacă nu cumva culturile Bt afectează prădătorii ce se hrănesc cu dăunătorii acestora, iar unele studii au arătat că ingestia dăunătorilor culturilor MG nu are impact negativ asupra speciilor prădătoare (Deem, 2013) [15].

S-au ivit discuții, așa cum s-a amintit deja, și în legătură cu promotorul 35S (secvență genică care determină cât, unde și când se exprimă proteina codificată de transgenă) folosit în experiențele de inginerie genetică la obținerea unor culturi comerciale, promotor despre care s-a speculat că ar fi instabil și s-ar putea transfera și insera în alte celule. Acest promotor provine de la virusul mozaicului conopidei (CaMV) și asigură expresia puternică a genei de care este legat. El, ca și alți promotori virali, folosiți în cercetările de inginerie genetică la plante, ar crește ratele de cancer la om, prin activarea unor gene (prin transferul pe orizontală), fapt ce nu a putut fi demonstrat, ADN-ul suplimentar din alimente fiind degradat rapid în timpul digestiei, (Lemaux, 2008) [54].

Există rețineri privind folosirea produselor MG și sub aspectul posibilității ca unele gene de rezistență la antibiotice din plantele MG (prin intermediul produselor MG) să fie transferate bacteriilor din microbiota intestinală umană și în acest fel antibioticele să nu mai aibă nici un efect la om în caz de nevoie [127]. Creșterea rezistenței bacteriilor la antibiotice este un fapt real și aceasta ar putea avea mai multe cauze: folosirea largă a acestora în terapia unor boli la om, utilizarea lor în stimularea creșterii în fermele de animale (a căror produse intră apoi în consumul uman), folosirea ca îngrășământ în agricultură a bălegarului rezultat din fermele de animale etc. Cum s-a discutat într-un capitol anterior, genele de rezistență la antibiotice sunt folosite uneori ca markeri în identificarea celulelor/plantelor transgenice, dar pentru a determina rezistență la antibiotice la animale și om ar trebui ca ele să se transfere bacteriilor (microbiotei) din tractusul digestiv al acestora. Procesul de degradare a celulelor din hrana ingerată de om și animale (inclusiv ADN) începe de la

contactul cu enzimele din saliva acestora și se continuă în stomac și intestin de către enzimele din tractul digestiv, în bucăți din ce în ce mai mici. Genele de rezistență la antibiotice din hrană nu pot rămâne intacte și nici elementele lor de control și integrare în cromosomul bacterian, pentru a se pune problema transferului acestora în microbiota intestinală de la om și animale (Lemaux, 2008) [54]. Citând o serie de autori, Sorochinskii et al. (2011) [99] arătau că, în urma unor experiențe destinate evaluării acestui risc, s-a demonstrat că posibilitatea transferului pe orizontală a acestor gene, de la plantele MG la bacterii, este puțin probabilă. Spre exemplu, probabilitatea de integrare a genei de rezistență la kanamicină de la plante MG în genomul bacterian, în condiții optime de transformare, este foarte scăzută (de 10^{-13}); tot astfel, în experiențe *in vitro*, s-a estimat că probabilitatea transferului genei pentru β -lactamază de la cartoful transgenic la bacterii, ar fi apropiat de zero (de cca 2×10^{-17} celule transformate).

Există totodată unele strategii pentru eliminarea genelor marker selectabile din genomul plantelor MG. Cea mai simplă constă în co-transformarea genelor de interes cu gene marker selectabile și apoi segregarea (separarea) genelor prin metodele geneticii clasice. O altă posibilitate, mai complicată, de a înlătura din genom aceste gene, este folosirea de recombinaze site-specifice aflate sub controlul unor promotori inductibili (Miki și McHugh, 2004) [70]. O alternativă de evitare a eventualelor riscuri induse de aceste gene este reprezentată de identificarea altor markeri selectabili (decât cei pentru rezistență la antibiotice sau toleranță la erbicide) pentru celulele modificate genetic. Unele abordări de acest gen se orientează spre genele pentru fosfomanoză-izomerază și xiloză-izomerază (care asigură avantaje metabolice celulelor transgenice față de cele obișnuite).

Un exemplu este oferit de transformarea genetică a orezului mediată de *Agrobacterium*, în care s-a folosit ca genă selectabilă fosfomanozo-izomeraza (*pmi*), care asigură inter-conversia manoză-6-fosfat/fructoză-6-fosfat, situație în care numai celulele de orez transformate sunt capabile să utilizeze manoză ca sursă de carbon. Au fost regenerate plante de orez transgenice care s-au dezvoltat din calusul derivat din embrioni imaturi, calus care s-a cultivat pe medii cu diverse concentrații de manoză (He et al., 2004). La rezultate asemănătoare au ajuns și Penna et al. (2008)[78] în cercetările lor pe aceeași plantă, care conchid că sistemul de selecție bazat pe manoză poate fi folosit cu succes în transformarea genetică mediată de *Agrobacterium* a embrionilor

maturi de orez, pentru a înlocui utilizarea markerilor genetici selectabili convenționali.

Principiul de lucru este același și când se folosește sistemul selectabil bazat pe xiloză-izomerază. Astfel, Haldrup et al. (2001) [39] au izolat genele pentru xiloză-izomerază (*xylA*) de la *Thermoanaerobacterium thermosulfurans* sau *Streptomyces rubiginosus* și le-au transferat, prin transformare genetică mediată de *Agrobacterium*, explantelor de cartof, tutun și tomate. Doar celulele transformate genetic (care conțineau gena *xylA*) puteau crește și regenera plante pe un mediu de cultură în care s-a înglobat xiloza (ca sursă de carbon). Plantele transgenice regenerate în acest sistem aveau un nivel de xiloză-izomerază de 5-25 ori mai mare decât plantele de control selectate pe mediul cu kanamicină.

Un argument adus împotriva folosirii OMG și produselor MG îl reprezintă securitatea (siguranța) alimentelor ce conțin ingrediente MG. Așa cum o să prezentăm mai jos, unele studii au arătat că șobolanii hrăniți cu soia și porumb MG au avut unele probleme de sănătate cu ficatul și rinichii, studii considerate însă nerelevante pentru om. Sunt aprecieri conform cărora unele teste de acest gen sunt prea scurte (doar 90 de zile) și este dificil de presupus care pot fi consecințele asupra sănătății omului prin consumul de alimente MG pe termen lung (multi-generații).

Lemaux (2008) [54] arăta că teste ample efectuate pe diverse animale hrănite cu furaje MG sau ingrediente MG au evidențiat diferențe nesemnificative între aceste animale și cele hrănite convențional sub aspectul digestibilității, sănătății și performanțelor acestora (unele aspecte de acest gen reieșind și din tabelul 23). S-a pus, cum am văzut deja, și problema sorții ADN și proteinelor codificate după ingerarea alimentelor sau furajelor provenite din plantele MG. Spre sfârșitul lui 2005, Ermakova (citată de același autor) prezenta la un simpozion internațional rezultatele unui studiu efectuat de ea pe șobolani hrăniți cu soia rezistentă la erbicide (Roundup Ready), care manifestau o mortalitate infantilă net superioară (55,6%) față de șobolanii hrăniți cu soia convențională (9%). Autoarea considera că fenomenul s-ar datora mutațiilor induse de ADN-ul transgenic inserat în genomul lor.

Aceste rezultate nu au fost confirmate de numeroase alte experiențe de acest gen efectuate pe șobolani și șoareci hrăniți cu soia tolerantă la erbicide, în care nu s-au observat efecte adverse privind dimensiunile, aspectul țesuturilor sau mortalitatea progenilor. În legătură cu acest aspect, Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară arăta în 2007 că ”După ingerare, se observă o degradare rapidă în scurte fragmente de ADN sau peptide în tractusul intestinal

al animalelor și oamenilor” și că ”Până în prezent un număr mare de studii experimentale efectuate pe animale de fermă au arătat că nu au fost decelate fragmente de ADN sau proteine derivate din plantele MG în țesuturile, fluidele sau produsele comestibile ale animalelor de fermă” (după Lemaux, 2008) [54].

Studii asemănătoare au fost întreprinse și asupra toxicității la animale și om a proteinelor Bt (*proteinele Cry*) cu efect insecticid asupra unor larve de fluturi și molii, gândaci și țânțari. Toxina Bt este de altfel cel mai important biopesticid din lume, folosit în special în combaterea insectelor dăunătoare *Ostrinia nubilalis* (sfredelitorul porumbului) și *Leptinotarsa decemlineata* (gândacul de Colorado), (Grubinger, 2000) [36]. Proteinele Bt formează, cum am arătat anterior, corpi proteici cristalini în bacteria *Bacillus thuringiensis*, de unde și numele de proteinele Cry. Aceste proteine sub forma lor întregă sunt inactice asupra larvelor de insecte, dar după ingestia lor de către larvele țintă se leagă la receptori specifici din intestinul mijlociu, sunt clivate în oligomeri activi, cu efect toxic (creează pori în membranele intestinului). Ele nu sunt toxice pentru mamifere, pentru că acestea nu dispun de receptorii specifici pentru aceste toxine (Lemaux, 2009) [55].

Companiile ce comercializează noi alimente MG trebuie să analizeze dacă proteinele introduse manifestă efecte alergice posibile. EPA a stabilit că proteinele Bt nu manifestă efecte toxice sau alergice asupra altor organisme decât cele țintă. Și totuși, sunt situații în care unele produse de acest gen au fost scoase de pe piață. Este cazul porumbului *Starlink* (SL), care exprimă proteina Cry9C. Potrivit unor teste și evaluări, produsele provenite din această varietate de porumb ar fi manifestat potențial alergen și, în consecință, au fost eliminate din consumul uman (în anul 2000), porumbul SL fiind comercializat doar pentru furajarea animalelor [127].

Posibilitatea ca omul să fie expus la noi alergeni prin produsele MG nu este exclusă, dar este dificil de demonstrat, pentru că există printre noi persoane mai sensibile decât populația generală la unii agenți din natură, care fac alergii la produse naturale, cum ar fi polenul, proteinele din grâu, orez, arahide etc (Lemaux, 2008) [54]. De altfel, Diehl (2013) [19] constată că, deși milioane de oameni consumă de cca 20 de ani produse din culturi MG, nu s-a semnalat nici un caz de alergii sau intoleranță, bine documentate, provocate de culturile MG.

Sunt de asemenea contestări sau îngrijorări și în privința obiectivității celor ce reglementează folosirea OMG și alimentelor MG, a însăși rigorii procesului de reglementare, a controlului exercitat de autorități asupra

companiilor ce fabrică și vând OMG și asupra suplimentelor de hrană ce conțin OMG etc.

Pentru că reglementările privind cultivarea și comercializarea culturilor MG și produselor MG diferă de la țară la țară s-a impus, cum era de așteptat, și găsirea unor metode de decelare a lor, pentru a le diferenția de cele nemodificate genetic. Identificarea culturilor și produselor MG se poate realiza fie prin decelarea la nivelul ADN a materialului genetic străin inserat sau prin studiul fenotipului exprimat (metode bazate pe studiul acizilor nucleici, în special a ADN, al proteinelor sau al caracterelor). Metodele de screening folosesc în general PCR, testele imunologice și biologice. De regulă, aceste metode sunt bazate pe tehnica PCR, datorită sensibilității și specificității ei înalte, a necesarului unor cantități mici de ADN (Tripathi, 2005; Adugna și Mesfin, 2008)[104, 1]. Avantajele folosirii testelor PCR constă și în amplificarea selectivă a unor segmente specifice de ADN care au o frecvență slabă într-un amestec ADN, reclamă cantități mici de reactivi și timp de realizare (comparativ - de exemplu, cu testele imunologice), molecula de ADN este relativ stabilă în cursul procesării. Metodele care se bazează pe analiza proteinelor sunt simple, rapide, ieftine și sigure, constituindu-se în metode complementare PCR pentru decelarea OMG, costurile cu reactivii/probă sunt mici, dar sunt mai puțin sensibile și mai susceptibile să dea rezultate false la contaminări minore, decât PCR etc (Adugna și Mesfin, 2008) [1].

Testarea (verificarea) alimentelor sau produselor OMG a devenit o operație de rutină, în care se folosesc tehnici moleculare ca DNA microarrays, PCR calitativă și cantitativă, teste bazate pe scrinul genetic al unor elemente (p35S, tNos, pat sau bar), sau markeri specifici pentru OMG (Mon810, bt11, GT73) etc. S-a ajuns până acolo în această direcție, încât poate fi decelat dacă uleiul rafinat de soia, de exemplu, este sau nu este MG[128].

În ciuda opoziției, protestelor și controverselor privind folosirea OMG și a produselor MG, acestea par a avea un viitor asigurat datorită unor avantaje ce nu pot fi neglijate și a presiunii exercitate asupra guvernelor de marile companii biotehnologice (care au investit enorm în aceste tehnologii și care, așa cum se întâmplă adesea, au câștig de cauză în fața opiniei publice), a fermierilor etc. Un argument în favoarea acestei concluzii îl reprezintă și faptul că pe 19 iunie 2013, liderii a 3 echipe de cercetare, care au inițiat aceste tehnologii și au prezentat în 1983 primele lor rezultate - R. T. FRALEY (de la Monsanto), M.

Van MONTAGU (Univ. din Gent, Belgia) și M. D. CHILTON (Univ. "Washington" din St. Louis) au primit *World Food Prize* (în valoare de 250 mii dolari) pentru aceste realizări remarcabile [133]. De altfel, sunt autori care consideră, ca și noi de altfel, că: *"Deși nici o activitate umană nu este garantată 100% ca sigură, culturile comerciale MG și produsele disponibile astăzi sunt cel puțin la fel de sigure ca și cele obținute prin metode convenționale"* (Lemaux, 2009)[55].

Două sunt problemele care frământă opinia publică în special, la care se așteaptă un răspuns ferm și convingător:

a) sunt culturile transgenice o soluție pentru foametea ce bânuie în anumite zone ale lumii?;

b) presupun ele riscuri inacceptabile pentru mediu și pentru sănătatea omului?

Trebuie să recunoaștem că în acest moment al dezvoltării și aplicării acestor tehnologii nu este ușor de dat un răspuns categoric la aceste întrebări, oricât am fi de cuceriiți sau speriați de potențialul ingineriei genetice. Este firesc să existe opinii pro- și contra ingineriei genetice. Orice tehnologie revoluționară, cum este și aceasta, a trecut prin astfel de momente. A folosi însă termenul de "poluare genetică", cum încearcă unii (Megha și Kaur, 2013) [67], atunci când vine vorba de riscurile genetice ce ar putea fi provocate prin scăparea în mediu a unor transgene, apare ca o abordare simplistă, neprofesională. Ce să înțelegem prin acest termen, că transgenele pot circula nestingerite în natură și provoaca adevărate catastrofe genetice?! Evident că este o exagerare și o mare eroare.

În opinia noastră, potențialul ingineriei genetice seamănă cumva cu cel estimat pentru energia atomică, la începutul secolului al XX-lea, inclusiv sub aspectul pericolului ei pentru viață. Chiar dacă folosirea energiei nucleare ne-a dat frisoane, ne-a provocat coșmaruri în câteva ocazii, asta nu a provocat abandonarea ei, în ciuda protestelor opiniei publice, pentru că binefacerile ei sunt mult prea importante și numeroase, iar omenirea nu a găsit soluții care să înlocuiască diversele ei aplicații. Într-un anume fel, tot cam așa stau lucrurile și cu ingineria genetică. Și ea poate face minuni, dar poate crea și dezastre, dacă scapă de sub control. Să ne gândim doar la ce ar putea însemna pentru viață și mediu modificarea genetică a unor microorganisme ca "arme" biologice, sau pentru a provoca anumite dezechilibre ecologice. Esențială rămâne folosirea acestor tehnologii de vârf în interesele umanității, ca ele să fie încurajate, dar să nu scape controlului riguros și permanent. Omul a demonstrat în multe ocazii capacitatea de a găsi soluții celor mai diverse și dificile probleme și că, de va fi

cazul, va face față cu succes și unor provocări la care îl va supune și expune genetica și mai ales ingineria genetică.

REFERINȚE

1. **Aduḡna A., Mesfin T.**, *Detection and quantification of genetically engineerd crops*. Journal of SAT Agric. Res., 2008, 6, 1-10.
2. **Alireza A. S., Masroori N., Kamyab A. R., Mansour B., Maliheh E.**, *Enhanced recombinant protein expression in the BTI-TN-5B1-4 insect cells*. Middle East J. of. Sci. Res., 2011, 7, 4, 515-520.
3. **Ammann K.**, *Biodiversity and GM crops*. 3-rd Turkish Symp. Agricultural Biotechnology and Biosafety. www.ask-force.org/web/Istanbul/Ammann-Biodiversity-Contribution-2008.pdf
4. **Amin L., Md Jahi J., Md Nor A. R.**, *Stakeholders' attitude to genetically modified foods and medicine*. Scient. World Journal, 2013, 14p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/516742>
5. **Baggle T.R., Kunkulol R. R., Baig M. S., More S. Y.**, *Transgenic animals and their application in medicine*. Int. J. of Medicine Res. And Health Sci., 2013, 2, 1, 107-116.
6. **Balamurugan V., Reddy G. R., Suryanarayana V. V. S.**, *Pichia pastoris: A notable heterologous expression for the production of foreign proteins – Vaccins*. Indian J. of Biotechnology, 2007, 6, 175-186.
7. **Bellon G., Pavirani A., Lamy D., Gilly R.**, *Peut-on guerir la mucoviscidose?* La Recherche, 1994, 270, 1119-1121.
8. **Berg P.**, *Asilomar, and recombinant DNA*, 2004. www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureats/1980/berg-article.html
9. **Bisht S. A.**, *Genetically modified crops held the key to food security*. The Times of India, 2013, 23 dec., 3p.
10. **Bruening G., Lyons J. M.**, *The case of the FLAVR SAVR tomato*. California Agriculture, 2000, 54, 4, 6-7.
11. **Byrne P.**, *Labeling of genetically engineered foods*. Colorado State Univ. Extension, 2010, 9. www.ext.colostate.edu/PUBSfoodnut/09371.pdf
12. **Camire J.**, *Chines hamster ovary cells for the production of recombinant glycoproteins*. Art to Science, 2000, 19, 1, 150-151.
13. **Carpenter E. J.**, *Impact of GM crops on biodiversity*. GM Crops, 2011, , 2, 1, 7-23.
14. **Dalton A. D., Ma C., Murthy S.G., Strauss H. S.**, *Bioplastic production by transgenic poplar*. ISB News Report, 2012, 4p.
15. **Deem R.**, *Genetically modified food: is it safe to eat genetically modified crops?* http://www.godandscience.org/apologetics/genetically_modified_food.html, Oct. 15, 2013.
16. **Degering C., Eggert T., Puls M., Bongaerts J.** et al., *Optimization of protease secretion in Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis by screening of homologous and heterologous signal products*. Appl. Environ.Microbiol., 76, 19, 6370-6376.
17. **Demain A. L., Vaishnav P.**, *Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms*. Biotechnol. Adv., 2009, 27, 3, 297-306.
18. **Deshpande N., Wilkins R. M., Packer N., Nevalainen H.**, *Protein glycosylation in filamentous fungi*. Glycobiology, 2008, 18, 8, 626-637.
19. **Diehl P.**, *Food allergies, intolerance and genetic engineering*. 2013. Biotech.about.com/od/Genetically-Modified-Organsims/fl/Food-Allergies-Intolerance...
20. **Dingermann T.**, *Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges*. Biotechnol. J., 2008, 3, 90 – 97.
21. **Dominguez A., Ferminan E., Sanchez M., Gonzales J. F., Perez-Campo F. M.** et al., *Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production*. Internat. Microbiol., 1998, 1, 131-142.

22. **Dus Santos M.J., Wigdorovitz A.**, *Transgenic plants for the production of veterinary vaccines*. Immunol. And Cell Biol., 2005, 83, 229-238.
23. **Endang T.M.**, *Transgenic animals: their benefits to human welfare*. Action Bioscience, 2003. <http://www.actionbioscience.org>
24. **Ferrer-Miralles N., Villaverde A.**, *Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue*. Microbial Cell Factories, 2013, 12, 1, 113.
25. **Fickers P.**, *Pichia pastoris: a workhorse for recombinant protein production*. Curr. Res. In Microbiol. And Biotechnol., 2014, 2, 3, 354-363.
26. **Gama Sosa M. A., De Gasperi R., Elder G. A.**, *Animal transgenesis: an overview*. Brain Struct. Funct., 2010, 214, 91-109.
27. **Garcia A. M., Altieri A. M.**, *Transgenic crops: Implications for biodiversity and sustainable agriculture*. Bull. of Sci. Technol. and Society, 2005, 25, 4, 335-353.
28. **Gerngross U. T.**, *Advances in the production of human proteins in yeasts and filamentous fungi*. Nature Biotechnol., 2004, 22, 1409-1414.
29. **Gertsberg D.**, *Loss of biodiversity and genetically modified crops*. GMO Journal, Food safety politics, 2011.
30. **Ghaderi D., Taylor R. E., Schantz A., Rajadhyaksha M, Davis H., Wagner C.**, *Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutics glycoproteins*. Nature Biotechnology, 2010, 28, 8, 863-867.
31. **Ghaderi D., Zhang M. Z., Hurtado-Ziola N., Varki A.**, *Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation*. Biotechnol and genetics Eng. Rev., 2012, 28, 147-176.
32. **Ghiorghiță I. G.**, *Bazele geneticii*. Edit. "Alma Mater", Bacău, 1999, 377p.
33. **Ghiorghiță G., Petrescu-Nicuță D.**, *Biotehnologiile azi*. Edit. "Junimea", Iași, 2005, 326p.
34. **Gordon J., Ruddle F.**, *Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei*. Science, 1981, 214, 4526, 1244-1246.
35. **Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfling E., Kemler R.**, *Transgenesis by means of blastocyst derived embryonic stem cell lines*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 9065-9069.
36. **Grubinger V.**, *Summary of concerns about transgenic crops.*, 2000. <http://www.uvm.edu/vtveg/>
37. **Gun S. K., Singh N., Giambrone J., Wu H.**, *Using transgenic plants as bioreactors to produce edible vaccines*. J. Biotech Research, 2012, 4, 92-99.
38. **Gupta A. K.**, *Transgenic rice review towards food security*. 2009. agropedia.iitk.ac.in/content/transgenic-rice-review-ak-gupta-phd
39. **Haldrup A., Noerrenmark M., Okkels T. F.**, *Plant selection principle based on xylose isomerase*. In vitro Cell. And Develop. Biol.-Plant, 2001, 37, 2, 114-119.
40. **Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E. Jr., Walll R. J. et al.**, *Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection*. Nature (London), 1985, 315, 680-683.
41. **He Z., Fu Y., Si H., Zhang S., Yu Y., Sun Z.**, *Phosphomannose-isomerase (pmi) gene as a selectable marker for rice transformation via Agrobacterium*. Plant Science, 2004, 166, 1, 17-22
42. **Jackson D. A., Symons R. H., Berg P.**, *Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA containing Iambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 2904-2909.
43. **Jaenisch R.**, *Germ line integration and mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 1260-1264.

44. **Jahic M.**, *Proces technique for production of recombinant proteins with Pichia pastoris*. PhD Thesis, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, 2003.
45. **Jayapal P. K., Wlasschin F. K., Hu W-S., Yap M. G. S.**, *Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting*. 2007. CHO Consortium SBE special section. www.aiche.org/sites/default.
46. **Jube S., Borthakur D.**, *Expression of bacterial genes in transgenic tobacco: methods, applications and future prospects*. Electronic J. of Biotechnol., 2007, 10, 3, 452-467.
47. **Kelly T. J., Smith H. O.**, *A restriction enzyme from Haemophilus influenzae. II. Base sequence of the recognition site*. J. Mol. Biol., 1970, 51, 393-409.
48. **Khan H. K.**, *Gene transfer technologies and their applications: roles in human diseases*. Asian J. Exp. Biol. Sci., 2010, 1, 1, 208-218.
49. **Kim Y. J., Kim G-Y., Lee M. G.**, *CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: curent state and further potential*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2012, 93, 917-930.
50. **Kollewe C., Vilcinskis A.**, *Production of recombinant proteins in insect cells*. American J. of Biochem. And Biotechnol., 2013, 9, 3, 255-271.
51. **Kumar V. B., Raja K. T., Wani R. M., Sheikh A. S., Lone A. M.** et al., *Transgenic plants as green factories for vaccine production*. African J. Biotechnol., 2013, 12, 43, 6147-6158.
52. **Kuzma J., Kokotovich A.**, *Renegotiating GM crop regulation*. EMBO Reports, 2011, 12, 9, 883-888.
53. **Lai T., Yang Y., Kong Ng S.**, *Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production*. Pharmaceuticals, 2013, 6, 579-603.
54. **Lemaux P. G.**, *Genetically engineered plants and foods: A scientist's analysis of the issue (Part I)*. Ann. Rev. Plant Biol., 2008, 59, 771-812.
55. **Lemaux P. G.**, *Genetically engineered plants and foods: A scientist's analysis of the issue (Part II)*. Ann. Rev. Plant Biol., 2009, 60, 511-559.
56. **Lim X. Z.**, *Cheese: The GMO food even die-hard GMO opponents eat and love (and oppose a label for)*. Genetic Literacy Project, 2014.
57. **Lin D.**, *Arguments for and against genetically modified organisms*. 2013. <http://animalrights.about.com/od/animalsusedforfood>.
58. **Loenen A. M. N., Dryden T. F. D., Raleigh A. E., Wilson G. G., Murray E. N.**, *Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes*. Nucleic Acids Res., 2013, doi: 10.1093/nar/gkt990.
59. **Ma H., Chen G.**, *Gene transfer technique*. Nature and Science, 2005, 3, 1., 25-31.
60. **MacDonald Glenn L.**, *Ethical issues in genetic engineering and transgenics*. Action Bioscience, 2013. (www.actionbioscience.org/biotechnology/glenn.html)
61. **Macer D.**, *Ethical, legal and social issues of genetically modified disease vectors in public health*. 2003, TDR/STR/SEB/ST03.1
62. **Maga A. M., Walker R. L., Anderson G. B., Murray J. D.**, *Consumption of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland results in the modulation in intestinal microflora*. Transgenic Res., 2006, 15, 515-519.
63. **Mandal S., Mandal R. K.**, *Storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering*. Current Sci., 2000, 73, 5, 576-589.
64. **Mahmoud K.**, *Recombinant protein production: strategic technology and a vital research tool*. Res. J. Cell Mol. Biol., 2007, 1, 1, 9-22.
65. **Maiorella B., Inlow D., Shauger A., Harano D.**, *Large scale insect cell-culture for recombinant protein production*. Nature Biotechnology, 1988, 6, 1406-1410.

66. **Mattanovich D., Branduardi P., Dato L., Gaser B., Sauer M., Porro D.,** *Recombinant protein production in yeasts. Recombinant gene expression.* Methods in Molecular Biol., 2012, 824, 329 – 358.
67. **Megha K., Kaur G. S.,** *Ecological impact of genetically modified crops.* Res. J. of Recent Sci., 2013, 2, 1-4.
68. **Menassa R., Zhu H., Karatzas C. N., Lazaris A., Richman A., Brandle J.,** *Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production.* Plant Biotechnol. J., 2004, 2, 431-438.
69. **Merlin M., Gecchele E., Capaldi S., Pezootti M., Avesani L.,** *Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: The green perspective.* BioMed International, 2014, ID136419, 14p. www.hindawi.com/journals/bmri/2014/136419
70. **Miki B., McHugh S.,** *Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety.* Journal of Biotechnology, 2004, 107, 3, 193-232.
71. **Milică I. C.,** *Biotehnologiile viitorului.* Edit. "Ion Ionescu de la Brad", Iași, 1999, 351p.
72. **Nevalainen H., Peterson R.,** *Making recombinant proteins in filamentous fungi – are we expecting too much?* Frontiers in Microbiology, 2014. journal.frontiersin.org/article
73. **O'Connor S., Hulbert K.,** *Gene therapy and its potential in treating cystic fibrosis.* 2012, Univ. of Pittsburg.
74. **Omasa T., Onitsuka M., Kim W. D.,** *Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells.* Curr. Pharm. Biotechnol., 2010, 11, 3, 233-240.
75. **Ormandi H. E., Dale J., Griffin G.,** *Genetic engineering of animals: Ethical issues, including welfare concerns.* Can. Vet. J., 2011, 52, 5, 544 -550.
76. **Panda K. A.,** *Recombinant DNA technology and biotechnology. Application of Biotechnology,* 2008. [nsdl.niscair.res.in/bistrear/123456789/608/1/Biotechnology Applic.pdf](http://nsdl.niscair.res.in/bistrear/123456789/608/1/Biotechnology%20Applic.pdf).
77. **Park J.R., McFarlane I., Phipps H. R., Ceddia G.,** *The role of transgenic crops in sustainable development.* Plant Biotechnol. Journal, 2010, 9, 2-21.
78. **Penna S., Ramaswamy B. M., Anant V. B.,** *Mannose-based selection with phosphomannose-isomerase (PMI) gene as a positive selectable marker for rice genetic transformation.* J. Crop Sci. Biotech. 2008, 11, 4, 233 – 236.
79. **Peterson G., Cunningham S., Deutsch L., Erikson J., Quinlan A et al.,** *The risk and benefits of genetically modified crops: a multidisciplinary perspective.* Ecology and Society, 2000, 4, 1, 13 (<http://www.ecologyandsociety.org/vol4/iss1/art13>).
80. **Phillips Th.,** *Genetically modified organisms (GMOs): transgenic crops and recombinant DNA technology.* Nature Education, 2008, 1, 1.
81. **Porro D., Sauer M., Branduardi P., Mattanovich D.,** *Recombinant protein production yeasts.* Molecular Biotechnol., 2005, 31, 3, 245-259.
82. **Pray L.,** *Recombinant DNA technology and transgenic animals.* Nature Education, 2008, 1, 1, 51.
83. **Qaim M.,** *The economics of genetically modified crops.* Annual Rev. Resour. Econ., 2009, 1, 665-693.
84. **Rao S.,** *Genetic engineering/Recombinant DNA technology.* www.microrao.com, 2006.
85. **Roberts J. R., Belfort M., Bestor T., Bhagwat S. A., Bickle A. T., Bitinalte J., et. al.,** *A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes.* Nucleic Acids Res., 2003, 31, 7, 1805 -1812.
86. **Roberts J. R.,** *How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology.* Proceed. Nat. Acad. Sci., 2005, 102, 17, 5905-5908.
87. **Sasson A.,** *Biotehnologiile – sfidare și promisiuni.* Edit. "Tehnică", București, 1988, 280p.

88. Schallmeyer M., Singh A., Ward O. P., *Developments in the use of Bacillus species for industrial production*. Can. J. Microbiol., 2004, 50, 1, 1-17.
89. Scheller J., Gurs K. H., Gosse F., Conrad U., *Production of spider silk protein in tobacco and potato*. Nature Biotechnology, 2001, 19, 573-577.
90. Schouten J. H., Krens A. F., Jacobsen E., *Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: International regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis*. EMBO Reports, 2006, 7, 8, 750-753.
91. Sears M. K., Hellmich L. R., Stanley-Horn D. E., Obershauser K. S. et al., *Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: A risk assessment*. Proceed. of Nat. Acad. Scie. USA, 2001, 98, 21, 11937-11942. www.pnas.org/content/98/21/11937.full
92. Sharma K. A., Jani D., Raghunat C., Tyagi K. A., *Transgenic plants as bioreactors*. Indian J. Biotechnol., 2004, 3, 274-290.
93. Shivanand P., Noopur S., *Recombinant DNA technology: Applications in the field of biotechnology and crime science*. Internat. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 2010, 1, 1, 43-49.
94. Sierro N., Battley N.D.J., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L. et al., *The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato*. Nat. Commun., 2014, 5:3833doi:10.1038/ncomms4833
95. Simmons D., *The use of animal models in studying genetic disease: transgenesis and induced mutation*. Nature Education, 2008, 1, 1, 70-74.
96. Smith H. O., Wilcox K. W., *A restriction enzyme from Haemophilus influenzae. I. Purification and general properties*. J. Mol. Biol., 1970, 51, 379-391.
97. Smith H. O., Nathans D., *A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction system and their enzymes*. J. Mol. Biol., 1973, 81, 419-423.
98. Snow A. A., Andow A. D., Gepts P., Hallerman M. E. et al., *Genetically engineered organisms and the environment: Current status and recommendations*. Ecological Applications, 2005, 15, 2, 373-404.
99. Sorochinskii B.V., Burlaka O. M., Naumenko V. D., Sekan A. S., *Unintended effects of genetic modifications and methods of their analysis in plants*. Cytology and Genetics, 2001, 45, 5, 324-332.
100. Sridhar Rao P. N., *Genetic engineering. Recombinant DNA technology*, 2006. www.microrao.com
101. Sun L., Hu R., Shen G., Zhang H., *Genetic engineering peanut for higher drought and salt-tolerance*. Food and Nutrition Sci., 2013, 4, 6A, 7p.
102. Swiech K., Picanco-Castro V., Covas T. D., *Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production*. Protein expression and Purification, 2012, 84, 147-153.
103. Tiwari S., Verma P. C., Singh P. K., Tuli R., *Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens*. Biotechnol. Adv., 2009, 27, 449-467.
104. Tripathi L., *Techniques for detecting genetically modified crops and products*. African J. Biotechnol., 2005, 4, 13, 1472-1479.
105. Tomita S., Munetsuna H., Sato T., Adachi T., Hino R. et al., *Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons*. Nature Biotechnol., 2002, 21, 52-56.
106. Uchimiya H., Handa T., Brar D. S., *Transgenic plants*. J. of Biotechnol., 1989, 12, 1-20.
107. Ubalua O. A., *Transgenic plants: Successes and controversies*. Biotechnol. and Mol. Biol. Review, 2009, 4, 6 118-127.
108. Van Eenennaam A., *Genetically engineered animals: An overview*. Aug., 2008, 6p. <http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech>
109. Vasconcelos M., Datta K., Oliva N., Khalekuzzaman M., Torizzo L. et al., *Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with ferritin gene*. Plant Sci., 2003, 164, 371-378.

110. Verma C., Nanda S., Singh R. K., Singh R. B., Mishra S., *A review on impacts of genetically modified food on human health*. The Open Nutraceuticals Journal, 2011, 4, 3-11.
111. Vithani N., *Transgenic animals - a boon by biotechnology*, 2008.
<http://www.pharmainfo.net/reviews/>
112. Walther W., Stein U., *Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases*. Drugs, 2000, 60, 2, 249-271.
113. Wang Y., Zhao S., Bai L., Fan J., Liu E., *Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors*. BioMed Res. Internat., 2013, ID 580463, 9p.
114. Weber W., Fussenegger M., *Insect cell-based recombinant protein production*. Cell and Tissue reaction Engineering – Principles and Practice. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 2009, 263.
115. Weinecker D., Rabert C., Zepeda A. B., Figueroa C. A., Pessoa A., Farias J. G., *Applications of recombinant Pichia pastoris in the healthcare industry*. Brazilian J. of Microbiology, 2013, 44, 4.
116. Weise E., *Genetically engineered crops in nearly 12% of fields*. USATODAY, Febr., 13, 2014.
117. Westers L., Westers H., Quax W. J., *Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism*. Biochim. Et Biophys. Acta, Mol. Cell Res., 2004, 1694, 1-3, 293-310.
118. Wheeler B. M., Farrand K. S., Widholm M. J., *Animal and plant transformation: the application of transgenic organisms in agriculture*. www.aces.uiuc.edu/vista/html_pubs/irpsm91/
119. Whitman B. D., *Genetically modified foods: Harmful or Helpful?* ProQuest, 2000.
www.csa.com
120. Wiebe M. G., Karandikar A., Robson G. D., Trinci A. P. I., Candida J. L. F. et al., *Production of tissue plasminogen activator (t-Pa) in Aspergillus niger*. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 76, 164-174.
121. Wiebe M. G., *Stable production of recombinant proteins in filamentous fungi – problems and improvements*. Mycologist, 2003, 17, 3, 140-144.
122. Ye X., Busov V., Zhao N., Meilan R., McDonnell M. L. et al., *Transgenic Populus trees for forest products, bioenergy and functional genomics*. Critical Rev. in Plant Sci., 2011, 30, 415-434.
123. Yunus M. M. A., Parveez G. K. A., Ho C-L., *Transgenic plants producing polyhydroxy-alkanoates*. Asia Pacific J. Mol. Biol. and Biotechnol., 2008, 16, 1, 1-10.
124. Zainol Z. A., Amin L., Rusly S. N., Akpoviri F., Sidik M. N., *The need for biosafety in developing countries: benefits and controversies*. African J. of Biotechnol., 2011, 10, 58, 12389-12394.
125. Zerek B., Rozga P., *Recombinant protein therapeutics – The future is here*. Laborant, 2012, 4, 34-37.

Site-uri de profil consultate

126. *Encyclopedia of Genetics*. Editor: Bryan D. Ness. ISBN 978-1-58765-149-6.
127. *Genetically modified crops. Resources for environmental literacy*. NSTA Press, USA, 2007, 36p (www.environment.literacy.org/).
128. *Genetically modified food*. en.wikipedia.org/wiki/Genetically_modified_food
129. *Transgenic organisms: ethical issues*. www.answers.com/topic/transgenicorganisms-ethicalissues
130. *Transgenic organisms*. 2011. www.checknomics.com/Industry_Overview.aspx

131. *Transgenic organisms*. www.visegeek.org/what-are-transgenic-organisms.html
132. *Recombinant DNA-technology. Steps in DNA cloning*. www.biosiwa.50webs.org/dnacloning.htm
133. *Genetically modified organism*. en.wikipedia.org/wiki/Genetically_modified_organism
134. *Introduction to cloning and recombinant DNA technology*. www.docstoc.com/docs/20373369/introduction-to-cloning-and-recombinant-DNA-technology
135. *Transgenic plants*. 2012. users.rcn.com/kimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/TransgenicPlants.html
136. *Genetically modified organism (GMO)*. www.britanica.com/science/genetically-modified-organism
137. *Restriction-Modification System*. www.what-when-how.com/molecularbiology/restriction-modification-systems-molecular-biology/
138. *Genetic engineering/Recombinant DNA technology*. 2006. www.microrao.com/genetic_engineering.pdf.
139. *What is genetic engineering?* www.buzzle.com/articles/what-is-genetic-engineering.html
140. http://en.wikipedia.org/wiki/Restriction_enzyme
141. http://en.wikipedia.org/wiki/Asilomar_conference_on_recombinant_DNA
142. http://en.wikipedia.org/wiki/Genetically_modified_tomato
143. http://en.wikipedia.org/wiki/Genetically_modified_soybean
144. http://en.wikipedia.org/wiki/Genetically_modified_maize
145. http://en.wikipedia.org/wiki/Genetically_modified_potatoes
146. http://en.wikipedia.org/wiki/Cotton_genetic_modification
147. ro.scribd.com/doc/97797996/Adn-Recombinant-Doc
148. www.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E/project-082306-130658
149. www.topdefinitions.com/picture?picture_genetically_modified_organisms
150. www.vintageveggies.com/news/terminator_gene.html
151. www.amgen.nl/english/about_biotechnology_recombinant_dna_technology.html
152. www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/Projects00/rdna/rdnaimpact.html
153. www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/renzymes.html
154. www.nepadbiosafety.net/subjects
155. http://en.wikipedia.org/wiki/Golden_rice

SUMMARY

THE GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS AND THEIR IMPLICATIONS

The remarkable success registered by the Molecular Genetics during the 6th and the 7th decades of the last century allowed the use of Genetic Engineering on live organisms. The gene transfer from one organism to another provides the *cisgenic* organisms (which are sexually compatible) and the *transgenic* organisms (sexually incompatible). In the European Union a GMO (genetically modified organism) is considered "an organism, excepting the humans, in which the genetic material was altered in an unnatural way – by *pairing* and/or *recombination*".

The following are necessary in view of transgenesis in *prokaryotes* and *eukaryotes*: the isolation of the gene of interest; a vehicle (*vector*) for the gene transfer and cloning in a cell/host organism. The most convenient method for gene isolation is the *recombinant DNA technology* (the addition of genetic material from a different organism). The first molecules of recombinant DNA were obtained by Paul Berg in 1972 (a hybrid DNA between the lambda phage and the genome of the SV40 virus), that was rewarded with the Nobel Prize in 1980. The genes of interest can be artificially synthesized or provided by starting from the mRNA of the specified protein (extracted from the tissue in which the protein of interest is well represented), by means of the reversed transcriptase a complementary monocatenary DNA chain (cDNA) is synthesized. It will become double-stranded by means of DNA-polymerase. The new gene, provided as previously mentioned or by chemical synthesis (the transgene or the passenger gene), is subsequently inserted (using the restriction enzymes and the DNA-ligases) in a vector for cloning and transfer (some plasmids, viruses etc). The cloning stages are: - the isolation of the gene; - the transfer of this gene within a vector; - the transfer of the recombinant vector into the host cell; - the identification of the genetically transformed cells (containing the transgene); - the cultivation of the selected clones to provide the desired product.

The restriction and modification enzymes

Discovered in 1970, the *restriction endonucleases* (RE) are a kind of 'molecular scalpels' capable of sectioning the DNA molecules in some specific regions (they detect certain nucleotidic sequences in the DNA), providing cohesive monocatenary ends (to which the DNA strands of the transgene bind). These are enzymes specific to the bacteria and the archaea, and represent a kind of primitive immunity by means of which these microorganisms fight against invading viruses. They belong to a *restriction and modification* system (RM). There is a great number of such enzymes (hundreds, even thousands), and their name derives from the bacteria in which they were identified. E.g.: *Eco RI* (comes from *E. coli*, strain RY13), *Bam HI* (comes from *Bacillus amyloliquefaciens*, strain Rd), *Bgl I* from *B. globigii* etc. The restriction enzyme *Eco RI*, for instance, recognizes the nucleotidic sequence 5'-G↓AATTC-3' (3'-CTTAA↓G-5') from the DNA. The R-M system is made of three main categories (types) of restriction enzymes: Type I, II, and III, to which Type IV is added, formed by enzymes that section the methylated DNA. The most utilized in the recombinant DNA technology are the Type II of RE-ases, among which there were discovered and characterized more than 3500 enzymes. The modification enzymes 'recognize' and 'alter' (by means of *methylation* or *glycozylation* reactions) the same nucleotidic sequence from DNA as the corresponding RE-ases. The alteration protects the self DNA from degrading, and the RE-ases prevent the insertion of foreign DNA into the bacterial genome. The restriction enzymes provided, together with the development of recombinant DNA and the identification of some DNA mapping and printing techniques (in view of monitoring the restriction fragment length

polymorphism, fact that allows the location of mutations, the making of human linkage maps, the detection of altered genes, and the solving of paternity cases in Forensics), the DNA sequencing, the identification of pathogenic bacterial strains in humans and animals.

Vectors used in gene transfer

The vector (vehicle) is a mediator between the transgene to be cloned (and transferred) and the host cell. It has to fulfill certain conditions to be useful to this action: - small sizes, and no essential genetic information in store; - autonomous autoreplication and tolerance provided by the host cell; - display of a sole recognition situs for the used restriction enzyme (such as the included gene will not alter its functions); - easy to isolate and sensitive to the same endonuclease such as the to-be-included transgene; - to trigger the display of easy to evince features in the host cell (such as: resistance to antibiotics, auxotrophy, specific lytic domains etc.) for the identification of genetically transformed cells etc.

In *microorganisms*, the *plasmids* are the most popular vectors for the gene transfer. The first vector plasmid, *pSC-101* (that comprised a marker gene for the resistance to tetracycline) was isolated in 1973 out of the resistance factor of *E. coli*. Other vector plasmids are: *pBR-322* (that comprises resistance marker genes for tetracycline and ampicillin), *pUC* (including a glucuronidase marker gene, colouring the cells in blue) etc. Several vector plasmids for *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. etc., were provided in the laboratory.

In *plants*, the most frequently used vectors are the *Ti* plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* (that cause the *crown-gall* tumors in some dicotyledonous species) and *Ri* plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* (that incites the *hairy roots* phenomenon). Some other techniques are used in the gene transfer in plants, such as: *microinjection*, *electroporation*, *endocytosis*, *biolistics* (a particle bombardment using DNA-charged gold or tungsten micro-particles), *PEG*, *liposomes* etc. Some of these techniques are used in animal organisms, as well. Of all the above mentioned methods, most of the genetically modified plants were provided using the *Ti* plasmids, the biolistics, and the electroporation. The biolistics has the advantage that, despite the genetic transformation or the electroporation, do not imply the usage of sole cells or of protoplasts, but it can be applied on intact or sectioned tissues. After the particle penetration into the cell nucleus, the DNA is released, and it can be integrated within the host cell genome. This is a random process, therefore the transgenes' possibility to be expressed or not, resulting the efficiency of this procedure (mainly a low one).

In *animals*, the simplest and most popular transgenic method is the microinjection into the egg cell (immediately after fertilization) of a solution containing many copies of the transgene. The foreign genetic material is injected into the pronuclei. The transgene may be injected in the stem embryo cells, in a blastocystic phase. The manipulated egg or the genetically transformed egg are later implanted into a mother for the gestation process. Some viruses are used as transgenetic vectors in animals: retroviruses, *lambda* phage mutants (called the Charon phages), *SV40* mutants, *bovine papilloma virus* (BPV), *lentiviruses*, vectors resulted out of the combination between phages, and plasmids (*cosmides*) etc. The most efficient transgenetic techniques in animals are: the DNA microinjection into the pronucleus of the egg cell immediately after fertilization, the embryo stem cells mediated transfer, and the retroviruses mediated transfer. The success rate in providing new born animals, bearing the transgene, is very low, regardless the method used.

Some achievements in transgenesis

The transgenesis comes with several advantages for the amelioration compared to the traditional methods: a) it is *more specific* (the researcher may choose the exact feature that he would like to promote, eliminating the unwanted additional characters); b) is *less time-*

consuming (the wanted feature takes only one generation to be promoted); c) it is *more flexible* (there can be acquired some new features, nonspecific to the genetically manipulated organism); d) it is *less expensive*.

Accomplishments of the transgenesis in bacteria, filamentous fungi, and yeasts

Towards the end of the 1970's there was an increasing number of successful experiments in the transfer of some transgenes for protein synthesis and hormones of medicinal interest into *E. coli*. The coli bacillus was manipulated to 'fabricate', at turns, various proteins, such as: hormones (insulin and its analogues, growth hormones, follicle-stimulating hormone, etc), blood products (albumine, thrombolytic and fibrinolytic compounds, clotting factors), cytokinins and growth factors (interferon, interleukin, colony stimulating factors), monoclonal antibodies and their related products, recombinant vaccines, recombinant enzymes (α -dornase, acid glucosidase, α -L-iduronidase, and urate oxidase), other products (bone marrow morphogenetic proteins, conjugated antibodies, pegylated recombinant proteins, antagonists) etc. There were genetically modified various microorganisms to provide certain enzymes necessary in the making of some food products: the bacterial alpha-amylase (to turn the starch into sugars), the fungal pectinesterase (for the enzymatic clarification of fruit juices) etc. *Aspergillus niger* (var. *awamori*) and *E. coli* (K-12) serve to obtain chymosin by means of fermentation. Several species of *Bacillus* are used in the industrial production of certain recombinant enzymes, as well.

A series of filamentous fungi (mainly *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, and *Trichoderma reesi*) turned into "factories" to provide recombinant proteins, particularly enzymes. These fungi have the advantage of owning an efficient secretion system, the ability to glycolize proteins, and have higher growth rates even than the plant, insect, or mammalian cells. The yeasts are efficient systems of producing recombinant proteins exceeding 50 kD, in high amounts and at a low cost price, may remove signal sequences, may be in charge of certain types of glycosylation, provide chaperonins needed in some protein folding, may process proteins rich in S-S etc. The yeast cultures have the advantage of being more productive and more cost efficient, compared to the expressing systems represented by other eukaryots, but have the flaw of non-accomplishing some post-translational complex changes (prolyl-hydroxylation and amidation, certain types of phosphorylation and glycosylation). The chymosin (FPC-fermentation produced chymosin) is very successful, replacing the rennet extracted from the young veal stomach, used in the cheese industry. There were isolated the rennet specific genes that were transferred in the yeast *Kluyveromyces lactis* or in the fungus *Aspergillus niger* therefore providing the transgenic rennet (that entered the market in 1990, sold by some companies under the name of MAXIREN and CHY-MAX, respectively). The chymosin (FPC) is considered the ideal milk curdling enzyme for the moment. The methylthrophic yeasts became more attractive hosts to provide recombinant proteins than the beer yeast, as they own strong expressing promoters, strictly tuned for the genes that encode certain proteins. Among these, a widely used one is *Pichia pastoris* that displays a high level of protein expression, is easily maintained, grows faster, is a cheaper system than other eukaryotic systems etc. Moreover, the *Pichia* expressing system is endowed with a large array of promoters, selection markers, secretion signals, a good knowledge of the glycosylation models etc. It is estimated that since 1984 more than 300 heterologous proteins were expressed using the *P. pastoris* system.

Accomplishments in the animal transgenesis

What is the purpose of the transgenetic animals? On the one hand, in order to provide animals with new features, and on the other hand due to the fact that some human proteins achieved by means of bacterial genetic engineering are not functionally active in humans; they have to

be post-translationally modified to become active, and the bacteria do not contain the specific enzymes for such changes. The aims of animal transgenesis are: the development of animal models that may be applied in the research of human diseases; the manufacture of industrial or retail goods (fibres, for instance); the production of substances for the human therapeutical use or of tissues and organs for xeno-transplants; the improvement of animal-human interaction (the hypoallergenic pets); the production improvement or of some feature quality (e.g.: fish with a faster growth, or pigs that digest food more efficiently etc.); the improvement of animal health condition (their resistance to diseases, for example) etc. It is estimated that the process of genetic engineering in animals is a slow, difficult, and expensive one. The first transgenic animal (a mouse) was obtained by R. Jaenisch in 1974, by means of DNA insertion (from the SV40 virus) in a mouse embryo in an early stage. There are some examples of human proteins produced by transgenic animals: antithrombin III, collagen, fibrinogen, fertility hormones, hemoglobin, serum-albumin, lactoferrin, tissue plasminogen activator (tPA), monoclonal antibodies etc. The farm animals that frequently serve to this purpose are mainly: the pigs, the cows, the sheeps, and the goats.

The most successful experiments in the animal transgenesis were performed on mice. In the study of human diseases there are at present: *the AIDS mouse*, *the Alzheimer mouse*, *the Onco-mouse* (patented by the DuPont Company), *the Young mouse* (a juvenile with a 20% longer life span than the common mouse), *the mouse resistant to influenza* (providing an extra amount of *Mx protein*, with antiviral effects), *the Super-mouse* (of large size, whose genome including the growth hormone gene in rats/humans) etc. There are mouse patterns for about 100 human mutant genes, that cause human-like diseases: some types of cancers, heart diseases, metabolic and hormonal malfunctions, diabetes, obesity, osteoporosis, skin pigmentation diseases, neurodegenerative disorders, deficiencies at birth (palatine uvula, anencephaly) etc.

The first farm transgenic animal was the *Tracy sheep* (in 1985), expressing high levels of α -1-antitrypsin, and the first transgenic cow, '*Rosie*', excreted α -lactoalbumin in milk. The transgenesis experts consider the mammal milk as a biological fluid to accumulate some human proteins of great interest. In February 2009, USFDA approved the first human product (*ATryn*, an anticoagulant), provided in transgenetic goat milk. The *gfp* gene (extracted from the *Aequorea victoria* jellyfish) was transferred to many animal species in order to provide the green fluorescent protein GFP. The gene can be linked to the mammal target genes, co-expressing with these ones. This fact enables the identification of the gene situs into the genome (*the reporter gene*). Its altered versions are used as biosensors. After the year 2000, in many countries there were obtained GFP pigs, useful in the study of the organ transplant in humans, to regenerate eye photoreceptor cells, some neurons in the brain, in the regenerative medicine stem cells, in the study of human diseases, etc. In 2011 GFP cats were provided, serving in the identification of anti-HIV treatment, or against the feline immunodeficiency (FIV) – related to HIV. By transferring the *phytase* enzyme gene in pigs, the pigs named *Enviro-pig* were provided, capable to digest the food rich in phosphorous (able to degrade the food phytates) and therefore eliminate 30-70% less phosphorous in the manure (considering the fact the phosphorous is a pollutant element). In fish, there were obtained salmons that produce growth hormones for the entire year (at a faster growth, doubling their size), salmons transgenic for the gene that codes an antigel protein from *Pleuronectes flesus* (more resistant to low temperatures), transgenetic carps for the growth hormone gene in the *Oncorhynchus mykiss*, or the MG fluorescent zebra fish *GloFish (Danio rerio)* (on the market since 2003), or the sensor zebra fish (that change colour in the presence of some pollutants) etc. The genetic engineering also includes mosquitoes. Some malaria resistant mosquitoes lab provided, or even male mosquitoes belonging to *Aedes aegypti* species (bearing the *Dengue fever virus*) to

whom a lethal gene was inserted, in view of diminishing the mosquito population (the mosquito population was reduced by 80% in the Cayman Islands in 2010).

In order to provide some therapeutical recombinant proteins (hormones, blood factors, monoclonal antibodies), to which glycosylation alters some of their features, there are used as expression systems: mammalian cells (CHO – Chinese hamster ovarian cell lines), insect cell lines, plant cell lines, and even human cell lines. Among these, the most efficient appear to be those based on mammal cells (mainly the CHO line). Considering their efficiency and use, the insect cell lines are in between the bacterial and the mammalian systems in the production of recombinant proteins. The most used lines come from the Schneider-2 (S2) cells, isolated in the late embryo stages of *Drosophila melanogaster*, and the Sf-9 cells, produced by the pupal ovarian tissue of the *Spodoptera frugiperda* butterfly. The most frequently used vectors in the expression of recombinant proteins within the insect cells are the baculoviruses (BEVS – *baculovirus expression vector system*), mainly NPV (*nuclear polyhedrosis virus*), that infects the insects (particularly the butterflies and the moths). This system allows the co-expression of heterologous genes and the procurement of multiproteic complexes or of specialized proteins (chaperons), and it is regarded as a great perspective in the making of recombinant vaccines, as well as in the use of baculoviruses as vectors in the gene therapy.

In the production of recombinant proteins there are used mammal cell lines, such as: Chinese hamster ovarian cells (CHO), baby hamster kidney cells (BHK), cells derived from mouse myeloma (NSO), green monkey kidney cells, human cell lines HEK-293, PER-C6, HKB11, CAP, HT1080. Among all these, the CHO system was and still remains very efficient and it is frequently used by the biotechnological companies. The tissue plasminogen activator (rtPA, Activase) was the first therapeutical recombinant protein produced by means of the CHO system, approved for clinical use in 1986. Since that year until 2011, 96 therapeutical recombinant proteins, produced by this expressing system, provide an estimate income of about 113 billion dollars in USA. Of the human cell lines, the HEK-293 line (derived of transformed human embryo kidney cells), is the most frequently used, on culture medium variants deprived of serum. Nevertheless, only a recombinant therapeutical protein provided by this expression system (*Xigris*), was patented. The HEK-293 cells are widely used to produce viral vectors.

Accomplishments in the plant transgenesis

The main stages in the process of obtaining genetically modified (transformed) plants are: the isolation of the gene of interest (from a different species) and its transfer (integration) into the recipient species genome (the transgenic species); the checking of the transgene manifestation in the host plant cells, and the regeneration of fertile plants out of the genetically modified cells (frequently by micropropagation); the control of the transgene's expression in the appropriate tissue, at the right moment; the checking of the inheritance of the intended feature, that confirms – or not, the success of the genetic transformation. The success in plant transgenesis is due to some marker genes that confer resistance to antibiotics, such as: the bleomycin, the cloramfenicol, the kanamycin, the streptomycin, the hygromycin, etc. The genes for GUS (β -glucuronidase), NPT II (*neomycin-phospho-transferase*), CAT (*cloramfenicol-acetyl-transferase*), *luciferase* etc, are frequently used. During the three decades from the first attempts in transgenesis, a variety of transgenic plants were provided, genetically modified for: the resistance to various abiotic and biotic factors, the sterility transfer, the improved amino acid content of some fodder plants, the delay of fruit maturation in some plants (by means of the *antisense RNA* technology), the gene transfer for some seed protein stock, the synthesis of some products of medicinal interest (hormones, vitamins, vaccins), the seed inactivation (using the '*terminator*' genes) etc. Considering their economical benefits, the plants that took advantage of this technology are: the maize, the rice,

the rape, the cotton, the soybean, the sunflower, the potato, the tomatoes, the tobacco, the cabbage, the lettuce, and so on.

The first accomplishment in plant transgenesis was recorded in 1983, when tobacco was 'endowed' with a gene belonging to kanamycin resistant bacteria. By transferring the gene that encodes the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) from *Agrobacterium tumefaciens* to soybean, it conferred the plants a tolerance to the herbicide *glyphosat* (Roundup). Similar crops were accomplished in tobacco and in poplar, by transferring the *aroA* gene from *Salmonella typhimurium*. The geneticists modified the EPSPS gene so it can be activated in the presence of the *glyphosat*, and afterwards the gene was transferred to a series of crops (cotton, soybean, rape, maize, tomatoes) in order to induce their herbicide resistance. Transferring the 'bar' gene from *Streptomyces hygrosopicus* to tobacco, tomatoes, and potato, plant resistance to the herbicide *phosphinothricin* was induced. There were obtained tobacco transgenic plants resistant to *bromoxynil* etc. Thus, the crops are more tolerant to herbicides. The crops resistant to herbicides became available on the market since mid 1980s.

To control the effects of some insects detrimental to agriculture, there were developed transgenic crops in cotton, maize, rice, soybean, potato, egg-plants, sun flower, cabbage, tobacco etc, by means of transferring the *cry* genes (that encode proteins with an insecticide effect) from *Bacillus thuringiensis* (bacteria that lives in soil), the cultures being named *Bt cultures*. The *cry* genes transferred to some crops confer them resistance to some specific pests, expand the harvest, and lead to an obvious decrease of the pesticide use. There were used various *cry* genes in the transgenesis of some crops: *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1F*, *cry9C* (against the butterfly larvae); *cry3A* and *cry3C* (against the cockroaches and their larvae); *cry34* and *cry35* (to terminate some *Diabrotica* species in maize). Such an example is the Bt cotton, to which the gene *cry1Ac* from *B. thuringiensis* was transferred, thus the cotton became resistant to a notorious pest – *Helicoverpa armigera*, that annually causes damages of at least 300 million dollars in the cotton crops in India (the cost of all the insecticides used in its control are of about 660 million dollars each year). There were imagined some strategies to prevent certain forms of resistant insects: the cultivation of coverts made of non-Bt plants next to the Bt crops (the idea was the insects will feed themselves with plants from these coverts, and will not develop resistance to the Bt toxin); the insertion in the same plant of two toxins with different modes of action; the cultivation of a mixture of seeds from Bt and non-Bt varieties; the use of inductible promoters (to ensure the expression of the Bt gene only during the insect attack), or the alterations of the toxins chemical structure.

To transfer the plant resistance to some viruses, there were cloned and then inserted into plants the genes for the viral cover protein. The first commercialized crops, resistant to virosis (the only ones until present) were: the pumpkin resistant to yellow mosaic virus and the papaya resistant to the ring spots virus. The resistance to the tobacco mosaic virus (TMV) was successfully transferred, as well as to the alfalfa mosaic virus (AMV), to the cucumber mosaic virus (CMV) etc. Promising results were obtained in tobacco, tomatoes, potato, alfalfa, papaya. The papaya crops in Hawaii were severely damaged and decimated by the ring spots virus (PRSV) during the 1980s, virus transmitted by means of aphids. Transgenic varieties of PRSV – resistant papaya were developed by transferring the genes for the viral cover protein, that were promoted and perpetuated in crops, and 80% of the Hawaiian papaya crops are genetically modified nowadays.

One of the major accomplishments of the Genetic Engineering (mainly in Asia) is the so called *golden rice*, that contains 20 times more β -carotene in the seed endosperm than the regular rice. It was obtained by the transfer of two genes: the *psy* gene (for phyoten sintase) from *Narcissus pseudonarcissus*, and the *crt1* gene (for carotene desaturase from *Erwinia uredovora*). In 2005, the scientists from Syngenta obtained 'Golden Rice 2', transferring the gene for phyoten sintase from maize and of the *crt1* gene from 'Golden Rice 1', a type of rice

that produced an amount of carotenoids 23 times higher than the first one (up to 37 µg/g). To fight against the lack of iron, affecting about 30% of the world's population, a new form of rice (rich in iron) was invented. In this case, a gene for *ferritin* (able to link iron) was transferred from beans into the rice genome, and also a gene from the fungus *Aspergillus fumigatus*, that encodes the synthesis of an enzyme that is responsible for the phytate digestion (as the phytates inhibit the absorption of iron). There are attempts of improving the protein quality in some crops (cereals and vegetables) by means of the transgenesis. One intends the insertion of genes that encode proteins rich in sulfur-containing amino acids in peas (its proteins are rich in lysin, but poor in methionine and cysteine), or the alteration of some cereal genes to provide an increase in the amount of essential amino acids within the pea proteins (in lysin, for instance). The *am1* gene for seed albumine (rich in essential amino acids) was transferred from *Amaranthus hypochondriacus* to potato. These experiments were successful because there was recorded a significant increase of some essential amino acids, as well as of the total proteins in potato tubers.

After 13 years of joint research, the companies Florigene (from Australia) and Suntory (from Japan) produced the *blue rose*, by transferring the gene for *delphinidin* in pansy, and a variant of the gene encoding the *dihydroflavonol 4-reductase* (DFR) – instead of its own, to allow the expression of the delphinidin pigment. These roses are commercialized all over the world nowadays. Lavender-colored carnations were provided in a similar way.

There is a growing interest to obtain (by means of genetically modified plants) the xenogene proteins, and accumulate them in certain organs (seeds, tubers etc). In some cases, such proteins were provided and stored within the endoplasmic reticle of the plant cells. There were successfully produced some proteins specific to the spiderweb in tobacco and potato transgenic plants.

A serious matter of the modern society is the pollution with plastic non-biodegradable waste, and the concern to produce biodegradable plastic material. In this view, is of great interest the genetic engineering of some plants aiming to produce non-traditional biopolymers. Another intriguing purpose of transgenesis is to provide luminescent plants by means of transferring the bioluminescence genes from cockroaches of the *Lampyridae* family to some plants, mainly trees, that will eventually light (in a suave and cold light) the streets and alleys at night. Other major challenges in plant genetic engineering are: nitrogen - fixing (*nif*) genes transfer from bacteria with this property to the non-vegetable plants (mainly cereals), the transfer of '*osm* genes' in plants (for the use of salty lands), the transfer of '*hsp*' genes for the thermic shock proteins (to increase the plant resistance to high temperatures), providing cold-resistant genotypes by means of gene transfer from microorganisms or animals into plants (from the freshwater bream to the potato, for example), the production of fodder plants with a lower lignin for ruminant mammals with a lower lignin content etc.

The experiments in Genetic Engineering aimed to produce some substances of medicinal interest, as well. The transgenic tobacco secreted the human growth hormone for the first time in 1986 (inserting the specific gene in the chloroplast DNA), and the first antibody in 1989. Later on, due to several appropriate transgenic tests in maize, there were provided some antibodies specific to infectious agents (such as: the HIV, the respiratory syncytial virus RSV, the herpetic virus), the proteic antigens used as vaccines (the anti-lymphoma vaccine, specific for each patient), other useful proteins as the lysosim and the trypsin etc. The transgenic tests in maize, potato, rice, soybean, and tomatoes aimed to provide human and animal vaccines: the vaccine against the pneumonic plague and the black plague, GM pollen (vaccine) to reduce the symptoms in allergic people, an oral vaccine based on GM rice to treat some allergic diseases like asthma, season allergies, atopic dermatitis. Some vaccines provided in plants are of great perspective for several diseases: the type I diabetes, the multiple sclerosis, the rheumatoid arthritis etc. If these 'drug' proteins are edible (the term 'edible vaccines' was

replaced with 'plant-derived vaccine antigens'), the more convenient and easy to ingest they are. There were many progresses in providing such compounds (mainly vaccines and antibodies) within the transgenic chloroplasts. The plastids combine certain protein expression features from prokaryotes and eukaryotes, therefore they seem a perspective in the production of viral particles and of bacterial antigens, mainly they display high levels of expression for the recombinant proteins. The plants may turn into genuine bioreactors that provide some antibodies at a large scale. The antibodies secreted by the transgenic plants are 10-50 times cheaper than the ones produced by the genetically modified bacteria. Though the success in achieving some recombinant proteins of medical interest in plants are numerous, there are many doubts regarding their therapeutical use. This may explain the fact that by mid 2012 only the glucocerebrosidase (an enzyme that lacks in Gaucher disease) obtained the approval for human use; it was synthesized in carrot and tobacco transgenic cultures (the drug was named *Elelyso*, approved by the US-FDA, and commercialized by the companies Protalix and Pfizer).

The genetic engineering in plants may include the concept of *terminator genes* (Technology Protection System – TPS), a smart system of seed inactivation (post maturation), used in the genetic protection of the seed production technology. The system is made of 3 transgenes: - a gene that encodes a *toxin* that becomes lethal at seed maturation; - a gene that encodes a *recombinase* (able to remove a blocking *spacer* called a *blocker*, that lies in between the promoter and the lethal gene); - a repressor gene – its product binds to the recombinase's promoter, keeping it inactive. Before their selling on the market as a culture start up, the seeds are moistured in a tetracycline solution that prevents the repressor protein synthesis. In this way, the recombinase is activated, and removes the blocking spacer (from the toxin gene), binding the promoter to the lethal gene. The provided toxin does not affect the seed germination, the plant growth and development, but becomes lethal after the seed complete development (it causes the loss of viability in the embryo). This technology was not commercialized, as it stirred many criticisms; the main risk would be that the system will be transferred from the MG plants to the non-MG plants and their related wild plants (by means of cross pollination), inducing their sterility. Such a protection system is T-GURT (trait-specific genetic use restriction technology), in which the genetic alteration is only expressed in the first generation plants. Despite the TSP system, unless the seeds are not activated before sowing, they will provide plants that do not manifest the MG character (and neither the plants resulting from accidental spreading or by replanting).

The experts in genetic engineering came with another intriguing technique, which is of an *antisense RNA*. By the use of the recombinant DNA, the synthetic genes that encode the antisense RNA may be inserted into organisms; therefore, the translation of the information in the mRNA specific to some genes is blocked. The moment in which mRNA binds a complementary RNA sequence (meaning an antisense RNA) the translation is blocked (either the ribosome has no access to the mRNA, or the RNA duplex is rapidly degraded by the cell ribonucleases).

This kind of successful experiment was accomplished in tomatoes. At present, the most varieties of marketed tomatoes are brought from faraway regions, and are harvested before riping. Thus, the ethylene synthesized by fruits facilitates their riping and causes major loss due to the fruit degradation until they reach to the consumers. The *Flavr Savr* transgenic tomatoes contain an antisense gene in their genome, that interferes with the synthesis of *polygalacturonase* (an enzyme that causes the fruit softening by cell wall pectin degradation). By means of the genetic engineering experiments, the researchers from Calgene reversed the orientation of the PG gene towards the CaMV35S promoter, that triggered the transcription of an antisense RNA, complementary to the normal (sense) mRNA of the PG. Following this path, the tomato plants synthesize only 5-10% of the normal amount of PG, (and after the year

1987, some tomato lines synthesized just 1% of the PG amount compared to the conventionally obtained tomatoes). Another method of delaying tomato fruit riping was an antisense gene encoding the enzyme involved in the ethylene synthesis (by diminishing the amount of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid – a precursor of the ethylene). This way, the fruits secrete only 10% of the normal amount of this enzyme, delaying their riping. The anti-sense RNA technology helped in the discovery of some gene functions (the target genes are inactivated – the KO organisms), and the phenotypical changes can be detected. At the same time, binding a strong promoter to the gene of interest, it becomes excessively expressed, and implicitly the consequences on the organism can be observed.

The capitalization of GMO and of GM products

In 2006, there were 72 pharmaceutical recombinant products on the market, worth 47.4 billion dollars/year. The global market of pharmaceutical recombinant proteins reached 87 billion dollars in 2008, and was expected to increase up to 169 billion dollars in 2014. Of all the 151 products approved in January 2009 in the USA and EU, the higher contribution was due to 29 monoclonal antibodies (over 40%), then the vaccines, the TNF blockers, some hormones such as the insulines and the erythropoietins. About 20% of these recombinant proteins were produced by the yeast cells, 30% by the *E. coli*, and 50% by the higher eukaryotes (mainly in the mammalian cells and in the hybridomas).

The benefits of the GM plants and cultures are: - more productive crops that need smaller amounts of fertilizers and pesticides, higher quality etc.; - unlike the traditional melioration in which the selection and promotion of a character may take many generations, a new genotype can be provided in the current generation by means of transgenesis; - the transgenesis is a more predictable technique, as there are transferred only some genes or groups of genes, and not thousands of genes from each parent (as it is the case of traditional amelioration); - the GMO food products appear to be safe (they were approved on the market in USA since 1995, and no health issues were registered until nowadays) etc. The technology of providing GM crops was one of the most quickly implemented in agriculture, with an incredible increase of 87 times in a short period of time (1996-2010). The first transgenic crops approved by the US-FDA to be marketed were: the FlavrSavr tomatoes (Calgene) - in 1994; the rape with a modified content (Calgene) in 1995; the Bt maize (Ciba-Geigy); the cotton resistant to bromoxynil (Calgene); the Bt cotton and the Bt potato (Monsanto); the soybean resistant to glyphosat; the pumpkin resistant to virosis (Monsanto-Asgrow); the late-ripping tomatoes (DNAP, Monsanto, Zeneca/Peto) etc. 25 GM crops received the cultivation approval in 2011. The GM crops were spread in 29 countries in the end of 2010, on a surface of 9.8 million km². In 2013, about 85% of the maize crops, 91% of the soybean crops, and 88% of the cotton crops in USA were genetically modified. 88% of the maize crops in the USA are GM for herbicide resistance. It was ascertained that the Bt cotton provided 30-80% higher crops than the regular cotton in India. There are no transgenic potatoes for human use on the market (in 1990, Monsanto came with the *New Leaf Bt potato*, though in 2001 this potato selling went down, the producers encountered big issues in selling this GM product). In 2009 the GM crops global market (seeds + biotechnologies) was estimated at 10.5 billion dollars. Since 2002 more than 60% of the processed food from the USA comprise at least one GM ingredient. The global transgenic seed market is supposed to come with a 12% profit every year.

Controversies in the use of GM crops and food

The development and release on the market of GMO (GM crops and GM fish) as well as the GM products, are submitted to very severe governmental regulations. In this respect, there are three national forums in USA: the State Department of Agriculture, the Environmental

Protection Agency, and the Food and Drug Administration. Considerable efforts are made for the approval of a GMO or of a GM product: tens of thousands of analysis, field tests, food safety tests on animals etc (for example, 31 agencies from 17 countries were trained to obtain the approval for the soybean cultures resistant to herbicides). To be noticed that the first step is to get the approval for the field tests of an GM crop. If the tests are successful, the company has to obtain the acceptance for seed commercialization, and later on they start the massive seed production to be sold to farmers. The farmers grow and sell the GMO at the market place. In 1986, the Economic Organization for Cooperation and Development (EOCD) published the first intergovernmental document entitled *Considerations for the safety assessment of recombinant DNA*, regarding the consequences of GMO use, that recommended the assessment of potential risks based on *case-by-case evaluation*. The Cartagena Protocol on Biosafety (adopted in 2000) display the steps in risk assessment, following the features of living modified organisms (LMO) that might come with a negative impact on the biodiversity, on the environment they are released in, and on the human health. The regulations on the GM crops and foods vary from one country to another, the most differences were pointed out between the USA and the European countries. Differential approvals are released in the EU depending on the purpose: cultivation/import and processing (there are more limitations on the matter of GMO cultivation). There are controversies on the issue of labelling the food containing GM ingredients. In the USA, Food and Drug Administration (FDA) does not constraint market labelling of GMO (the GMO supporters consider the labelling as a warning). The environmentalists from all over the world and the public media specifically require this regulation, as the people should decide whether or not they will consume GM food/products. In EU countries the release of GMO in the environment is illegal, and the food products comprising more than 1% GM ingredients have to be labelled.

Although the genes that are artificially transferred from one organism to another exist in nature, there are controversies in expressing them in a foreign organism. The main arguments/doubts against the use of GMO are linked with: - GM food product safety. Some tests proved that the rats previously fed with GM soybean and maize displayed liver and kidney disorders; the studies were considered to be irrelevant to humans. Some opinions state that these tests are too quick (only 90 days) impeding the assessment of GM food consequences for a long term (over many generations); - some reservations result from the fact that GM products would expose humans to new allergens or they might cause the transfer of some antibiotic resistant genes (used as genetic markers) in the human intestinal microbiota; - there are many apprehensions on the risk of horizontal transfer (from the GMO to other organisms, such as bacteria) of certain genes for the herbicide, pesticide, and antibiotics resistance, that would endanger not only the human health, but will lead to major ecological disaster (it is known that, although the horizontal natural gene transfer in microorganisms is possible, the success rate is very low); - the gene transfer from the GM plants to bacteria is even less probable, as the plant genes contain introns, whilst the bacterial genes are continuous); - some people consider that there are greater risks regarding the vertical transfer of such genes. Some herbicide resistant GM plants introduced into cultures might trigger the growth of *superweeds* (more invasive and more dangerous than the regular ones). Although these GM weeds do not exist so far, the risks are not excluded for those plants with wild related plants, such as: the maize, the turnip, the cotton, the rice. To avoid such a perspective, it is recommended the transgenic culture start-up in those regions deprived of wild plants related to the GM plants. There was a famous controversy stirred in 1999, concerning the Bt maize. Losey et al. claimed that the GM maize pollen might reach on the leaves of *Asclepis syriaca* next to the maize fields, and would cause the death of the monarch butterfly (*Danaus plexipus*). Subsequently six complex research teams ran thorough tests, and came with the conclusion that the Bt maize risks on this butterfly species are 'very low'.

The transgenesis is challenged by some people due to the risk of spoiling the **ecosystems**. One example is the growth hormone transgenic salmon (its growth rate is twice faster compared to the native salmon), that might accidentally escape from the fish farms, invade the natural ecosystems, and compete with the native salmon for food, space, breeding. The right fullness of the regulation process is questioned and doubted, as well as the objectivity of the people who implement the regulations on the GMO and GM food products, on the control exerted by the authorities on the GMO distribution and market companies, and on food supplements that contain GMO etc. Some GMO opponents (mainly environmentalists) appeal to the ethical arguments, considering that these genotypes appeared unnaturally, and that some animals are genetically modified for human benefits, that represents a manipulation of life itself, and a violation of the species' innate rights. Unfortunately, even some of these groups act unethically. In 1999, for example, the environmentalists destroyed a GM poplar plantation near London (its purpose was exactly to check the veridicity of some environmentalists' claims), and in 2000 some groups of GM food opponents vandalized several laboratories, and destroyed non-transgenic field crops in the USA.

The tests on the GMO food or products turned into a routine procedure, that implies several molecular techniques, such as: the *DNA microarrays* and the *quantitative PCR*, other tests based on the genetic screening for some chemical elements (*p35S*, *tNos*, *pat*, or *bar*), and the GMO specific markers (*Mon810*, *bt11*, *GT73*) etc. These research advanced so much that it is possible to detect whether or not the refined soybean oil is GM or not. There is still no certain evidence that the approved GM food is detrimental to the human health.

Despite the opposition, the protests, and the controversies regarding the use of GMO, they seem to be of great perspective, due to some benefits that cannot be disregarded, and due to the pressure imposed on the governments by the biotechnological companies (that invested huge sums of money in these technologies, and win the fight against the public opinion), by the farmers etc. In June 2013, the leaders of three research teams, that initiated these technologies, and came with their own first results in 1983 - R. T. Fraley (from Monsanto), M. Van Montagu (Gent University, Belgium), and M. D. Chilton ('Washington University' in St. Louis) were awarded the *World Food Prize* (250.000 \$) for '*the quality, amount, and availability*' of the food in the world, fact that can be considered an argument favourable to this statement. Nevertheless, we should remain responsible and aware, yet optimistic, on the matter of GMO and GMO products.

PRINTED IN ROMANIA



Tipar digital realizat la Editura și Tipografia PIM
Șoseaua Ștefan cel Mare și Sfânt nr. 4, Iași – 700497
Tel.: 0730.086.676, 0732.430.407, 0733.004.203;
Fax: 0332.440.715
E-mail: editura@pimcopy.ro
www.pimcopy.ro