

INTEGRACIÓN ESPONTÁNEA DE FRAGMENTOS DE ADN HUMANO EN LAS CÉLULAS DEL HUESPED

K. KOYAMA, T. A. DEISHER

SOUND CHOICE PHARMACEUTICAL INSTITUTE, SEATTLE, WA

INTRODUCCIÓN

Tres publicaciones recientes en la revista Neuron dan cuenta de la presencia de cientos de diferentes mutaciones de novo, indicando que los trastornos del espectro autista (TEA) pueden ser enfermedades de inestabilidad genómica, con un importante componente medioambiental. El nexo común entre las distintas mutaciones genéticas que han sido descritas en los TEA son diversos procesos de rotura de la doble hélice junto con una alteración en sus rutas de reparación. En la curva de incidencia de autismo en los Estados Unidos hay puntos de inflexión evidentes en los años 1980, 1988 y 1996, coincidiendo con la introducción en el calendario vacunal infantil de vacunas contaminadas con retrovirus K endógeno humano (HERVK, por sus siglas en inglés) y fragmentos de ADN fetal humano (6). Nuestra hipótesis es que tanto el HERVK como el ADN fetal humano presentes en las vacunas como contaminantes pueden contribuir a la inestabilidad genómica en los TEA, demostrada por la presencia de mutaciones de novo.

El ADN libre puede ser captado por las células sanas a través de un transporte mediado por receptor, o puede atravesar espontáneamente las membranas celulares que tienen alterada la permeabilidad, lo que ocurre, por ejemplo, durante los procesos inflamatorios. Se piensa que la captación por el núcleo celular de fragmentos libres de ADN es una fuente para mantener la integridad del ADN en las horquillas de replicación bloqueadas o en la reparación de lesiones de las bases. Además, la captación espontánea de ADN extracelular se ha utilizado tanto en terapia genética como en la corrección de genes celulares (2, 4, 5, 7, 8 y 9). A pesar de que la captación celular de ADN libre se utiliza de manera provechosa, estos procesos se han asociado al mismo tiempo con la producción de mutaciones y aberraciones cromosómicas (3).

Las vacunas que se producen utilizando células fetales humanas contienen fragmentos de ADN residual (50-500 pb) (Tabla I). Es posible que estos fragmentos contaminantes puedan ser incorporados al genoma infantil y alterar la función normal de los genes, y conducir a fenotipos de autismo. En este estudio demostramos la captación por células humanas de ADN del exterior y su integración en el genoma, incubando las células con fragmentos de ADN Cot-1 humano (placenta) marcado con Cy3, que representan el DNA fetal humano residual contaminante en las vacunas.

Tabla 1. Niveles de ADN humano residual bicatenario (PicoGreen assay) y ADN humano monocatenario (OliGreen assay) en las vacunas de la rubéola (Meruvax II) y la hepatitis A (HAVRIX).

Nombre de la vacuna	ADN bicatenario (ng/vial)	ADN monocatenario (ng/vial)	Longitud (pbs)
Meruvax II (Rubéola)	142.05	35.00	240
HAVRIX (Hepatitis A)	276.00	35.74	No cuantificable

MATERIAL Y MÉTODOS:

ADN Cot1 humano (Invitrogen) marcado con el equipo Mirus Label IT Cy3 (marca registrada) Labelling Kit (Mirus).

Se cultivaron células U937 (monocitos) en DMEM (Dublecco's Modification of Eagle's Medium) al que se añadió un 15% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de solución antibiótica y antimicótica, a 37°C y en atmósfera humidificada, con 5% de CO₂ y 95% aire ambiente. Células HL-60 (mieloblastos) se cultivaron en IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) con 20% FBS y 1% de solución antibiótica/antimicótica, a 37°C, bajo las mismas condiciones. 750 ng de ADN Cot-1 humano marcado con Cy3 se incubó por cada 10.000.000 células durante 24 y 48 horas.

La captación de ADN por parte de la célula y del núcleo celular se analizó con microscopio de fluorescencia. El ADN genómico de las células U937 se purificó por precipitación en etanol, eliminando los fragmentos cortos de ácido nucleico, incluyendo el ADN Cot1 humano marcado con Cy3 no incorporado. La cantidad de ADN Cot1 marcado con Cy3 incorporado a los cromosomas de las células se cuantificó utilizando la unidad de fluorescencia relativa (RFU) medida con fluorímetro.

Células sin adherencia NCCIT (teratocarcinoma) se cultivaron con una densidad de 30.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos, un cubreobjetos de vidrio alemán se colocó en cada pocillo a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo un 5% de CO₂ y un 95% de aire. Células HFF1 (fibroblasto 1 humano de prepucio) se cultivaron en las mismas condiciones salvo el medio de cultivo que en este caso fue DMEM con 15% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de solución antibiótica-antimicótica.

Células BE (2)-C (neuroblastoma) se cultivaron en las mismas condiciones excepto el medio de cultivo utilizado que en este caso fue una mezcla 1:1 de EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) y F12 suplementado con 10% FBS y 1% de solución antibiótica-antimicótica. Células M059K (línea celular de glioblastoma que expresa niveles normales de la proteinquinasa dependiente de ADN, con capacidad de reparar las roturas de la doble hélice de ADN) y M059J (otra línea celular del mismo glioblastoma, con déficit de actividad proteinquinasa dependiente de ADN y alteración en los mecanismos de reparación de la doble hélice de ADN) se cultivaron también en las mismas condiciones excepto que el medio utilizado fue una mezcla 1:1 de DMEM y medio F12 de Ham suplementado con 10% de FBS, 0.05 mM de aminoácidos no esenciales y 1% de solución antibiótica-antimicótica. Después de que las células fueran cultivadas de esta manera durante dos/tres días se añadieron 500 ng de ADN Cot-1 humano marcado con Cy3 y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂ y 95% de aire, agitando suavemente durante 24 y 48 horas. Después de la incubación se tiñó el núcleo con Hoechst, se colocaron cubreobjetos de vidrio alemán sobre los portaobjetos, y se analizó la captación celular y nuclear de ADN con microscopio de fluorescencia.

Para estudiar el efecto de la inflamación, todas las líneas celulares adherentes se activaron con lipopolisacárido (LPS). También se midió la alteración de la permeabilidad con saponinas en las células HFF1. Tres concentraciones de LPS, 1 ng/10.000 células, 10 ng/10.000 células y 100 ng/10.000 células se testaron en los pocillos que contenían las líneas celulares anteriormente mencionadas. Las células se incubaron con ADN Cot-1 humano marcado con Cy3 y LPS a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂ y 95% aire, agitando suavemente 24 horas y 48 horas. Al igual que las células incubadas sin LPS, estas células también se tiñeron con Hoechst antes de analizar la captación celular y nuclear de ADN con microscopio de fluorescencia.

Las células HFF1 se incubaron con un 0.02% de saponinas, 300 ng de DAPI y 500 ng de ADN Cot-1 humano marcado con Cy3 durante 24 horas, 48 horas y 72 horas. Estas células también se observaron bajo microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS (Tabla II)

La captación espontánea celular y nuclear de ADN fue evidente en las células HFF1, NCCIT y U937 (figs. 1, 3, 7 y 8). La captación de ADN en las células BE (2)-C y M059K no fue valorable por la elevada autofluorescencia de estas células. No se observó señal de Cy3 en HL-60 (mieloblastos). Con la inflamación causada por los LPS se observó captación celular de ADN en las líneas celulares de HFF1, NCCIT, M059J y U937 (figs. 2, 4, 5 y 6).

La cantidad de ADN Cot-1 humano marcado con Cy3 incorporado al genoma de la línea celular U937 fue de 0.0111 +/- 0.0034 pg (n=12) por célula en 24 horas, lo que representa aproximadamente el 0.167% del total del ADN genómico de las células U937. La incorporación de ADN en las células NCCIT fue de 0.0026 pg/célula en 24 horas y 0.04 pg/célula en 48 horas, lo que supone el 0.6% del ADN genómico total de las células NCCIT.

Tabla 2: captación de ADN en varias líneas celulares

Línea celular	Captación celular espontánea	Captación nuclear espontánea	Incorporación en ADN genómico	Captación celular/nuclear con LPS o saponinas
HFF1	Sí	Sí	No realizado	Aumentada/aumentada
NCCIT	Sí	Sí (variable)	0.0026 pg/célula en 24 h 0.04 pg/célula en 48 h	Igual/igual
BE (2)-C	No	No	No realizado	No/no
M059K	No	No	No	No/no
M059J	No	No	No realizado	Sí/no
U937	Sí	Sí	0.011 +/- 0.003 pg/célula en 24 horas	Igual/igual
HL60	No	No	No	No

DISCUSIÓN

La incorporación que hemos medido, de 0.2% - 0.6% del total del genoma en 24 a 48 horas (de 0.003 a 0.4 pgs) parece alta a primera vista. Sin embargo, nuestras cifras concuerdan con estudios previos que muestran que en treinta minutos hasta el 1% del total del genoma se reemplaza por ADN exógeno (6). Aunque las células HL-60 no captan espontáneamente ADN exógeno en nuestros experimentos, la línea celular ha sido usada en el pasado como modelo de captación espontánea de ADN (8).

La captación celular y nuclear de ADN en fibroblastos humanos de prepucio (HFF1) y en células NCCIT sugiere que las células embrionarias y neonatales tienen más tendencia a captar ADN exógeno que células más maduras. Estos resultados indican la necesidad de un mayor estudio de la incorporación de ADN exógeno para comparar la susceptibilidad de niños pequeños frente a adolescentes y adultos.

El aumento de la captación de ADN después de la activación con LPS sugiere que la inflamación sistémica o la respuesta inmune podría incrementar la susceptibilidad para la captación de ADN exógeno. Las vacunas producidas en células diploides humanas están contaminadas por fragmentos de ADN exógeno y retrovirus, y las vacunas inducen también inflamación sistémica y activación de la respuesta inmune. Los objetivos de

nuestra investigación futura son localizar los lugares de integración del ADN, demostrar los cambios en el fenotipo producidos por la integración de ADN exógeno en líneas celulares factor-dependientes, y determinar la actividad biológica y/o patológica de los fragmentos del retrovirus K endógeno humano (HERVK) presentes en las vacunas.

Tabla 3. Descripción de las líneas celulares

Línea celular	Tejido de origen	Morfología	Transfection host
U937	Linfoma histocítico	Monocito	Sí
HL60	Leucemia	Mieloblasto	Sí
BE (2)-C	Neuroblastoma	Neuroblasto	No
M059K	Glioblastoma	Fibroblasto	No
M059J	Glioblastoma	Fibroblasto	No
HFF1	Prepucio	Fibroblasto	No

CONCLUSIÓN

No sólo las células humanas alteradas, sino también las sanas pueden captar espontáneamente ADN exógeno. Este ADN exógeno captado por las células humanas será transportado al interior del núcleo y se integrará en el genoma del huésped, originando cambios en el fenotipo celular. Por lo tanto, los fragmentos residuales de ADN fetal humano que se encuentran en las vacunas pueden ser una causa de trastornos del espectro autista en niños debida a la vacunación. Las vacunas deben ser seguras, sin ningún contaminante por ADN humano o virus reactivados, y sus procesos de producción deben responder a planteamientos éticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Golan M, Hizi A, Resau J, Yaa-Hahoshen, Reichman H, Keydar I, and Ian Tsarfaty. "Human Endogenous Retrovirus (HERV-K) Reverse Transcriptase as a Breast Cancer Prognostic Marker" *NEOPLASIA*, Vol.10, No.6, June 2008, pp. 521-533.
2. Filaci G, Gerloni M, Rizzi M, Castiglioni P, Chang H-D, Wheeler MC, Fiocca R, and Zanetti M. "Spontaneous transgenesis of human B lymphocytes." *Gene therapy*, 2004, 11, 42-52.
3. Howe S, Mansour M, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, Brugman M, Pike Overzet K, Chatters S, Ridder D, Gilmour K, Adams S, Thomhil S, and other 14. "Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy." *Journal of Clinical Investigation*. Vol 118, No.9, September 2008.
4. Lehmann MJ, and Sczakiel G. "Spontaneous uptake of biologically active recombinant DNA by mammalian cells via a selected DNA segment." *Gene Therapy* 2005, 12, 446-451.

5. Rogachev V, Likhacheva A, Vratskikh O, Mechetina L, Sebeleva T, Bogachev S, Yakubov L, and Shurdov M. "Qualitative and quantitative characteristics of the extracellular DNA delivered to the nucleus of a living cell" *Cancer Cell International*, October 2006, 6:23, P1475-2867.
6. Victoria J, Wang C, Jones M, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, and Delwart E. "Viral Nucleic Acids in Live-Attenuated Vaccines: Detection of Minority Variants and an Adventitious Virus." *Journal of Virology*, June 2010, P.6033-6040.
7. Yakubov L, Deeva E, Zarytova V, Ivanova E, Ryte A, Yurchenko L, and Vlassov V. "Mechanism of Oligonucleotide uptake by cells: , September Involvement of specific receptors?" *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 86, pp 6454-6458, September 1989.
8. Yakubov A, Petrova N, Popova N, Semenov D, Nikolin V, and Os'kina I. "The Role of Extracellular DNA in the Stability and Variability of Cell Genomes." *Doklady Biochemistry and Biophysics*, Vol. 382, 2002, pp.31-34.
9. Yakubov L, Rogachev V, Likhacheva A, Bogachev S, Sebeleva T, Shilov A, Baiborodin S, Petrova N, Mechetina L, Shurdov M, and Wickstrom E. "Natural Human Gene Correction by Small Extracellular Genomic DNA Fragments." *Cell Cycle* 6:18, 2293-2301, 15 September 2007