

# Las vacunas de ARNm para COVID-19 contienen cantidades excesivas de ADN bacteriano: evidencia y trascendencia

**Michael Palmer, MD y Jonathan Gilthorpe, PhD**

5 de abril de 2023

## **Abstracto**

Estudios recientes realizados por Kevin McKernan, un destacado experto en métodos de secuenciación de ADN y ARN, han revelado que los lotes de vacunas de ARNm modificadas producidas tanto por Pfizer como por Moderna contienen una alta proporción de ADN bacteriano contaminante. En total, el ADN representa hasta un 20-35% de los ácidos nucleicos contenidos en cada uno de los lotes de vacunas. Estas concentraciones alarmantemente altas superan con creces los niveles considerados seguros por organizaciones normativas como la Agencia Europea de Medicamentos (AEM). Este documento resume la evidencia de esa contaminación de ADN y discute los posibles riesgos para la salud que implica para los receptores de las vacunas.

## **1 El papel del ADN en la fabricación de vacunas de ARNm**

**1.1 Antecedentes generales.** La mayoría de los lectores sabrán que

1. los ARN sintéticos contenidos en las vacunas de ARNm de COVID-19 codifican la proteína espiga del SARS-CoV-2;
2. en las células vivas de los mamíferos, las instrucciones para construir una determinada molécula de proteína se almacenan como un gen dentro del ADN dentro del núcleo;

3. Para construir una molécula de proteína determinada, la célula primero transcribe su gen en ARN y modifica los dos extremos de esta molécula para formar ARN mensajero (ARNm). Luego, el ARNm se transporta desde el núcleo hasta el citoplasma, donde induce a las fábricas de proteínas de la célula, los *ribosomas*—para traducir la secuencia de nucleótidos del ARNm en la secuencia de aminoácidos correspondiente y ensamblar la proteína.

**1.2 Pasos en la fabricación de vacunas de ARNm.** Dado que la proteína espiga es una molécula grande, también lo es el ARNm que la codifica. La síntesis química total de grandes moléculas de ARNm no es práctica a escala. Por lo tanto, para obtener la molécula de ARNm que codifica la espiga, se imita in vitro el proceso mediante el cual las células producen sus propios ARNm. Esto implica los siguientes pasos:

1. Una copia de ADN del gen de la proteína espiga se inserta en un *plásmido* bacteriano. Esta es una molécula de ADN de doble cadena en forma de anillo que puede existir en una célula bacteriana independientemente del propio ADN cromosómico de la célula, y que también puede copiarse y transmitirse a ambas células hijas cuando esa célula se divide.
2. El plásmido *recombinante* (artificial) que porta el gen de la proteína espiga se introduce en una célula de la especie bacteriana *Escherichia coli* (*E. coli*). Desde *E. coli* las células se dividen muy rápidamente, esta célula puede crecer en poco tiempo hasta convertirse en un gran número de células. Cada una de estas células de la progenie contendrá sus propias copias heredadas del plásmido y, por lo tanto, del gen de la proteína espiga.

Si bien existe una cierta posibilidad de que algunos de los descendientes pierdan el plásmido durante las divisiones celulares sucesivas, podemos imponer su mantenimiento dándole un marcador seleccionable, lo que garantiza que solo sobrevivirán aquellas células que retengan el plásmido. Con los plásmidos utilizados tanto por Pfizer como por Moderna, este marcador de selección es un gen que dota a las células huésped de resistencia al antibiótico kanamicina. Para aplicar la selección, las bacterias simplemente se cultivan en presencia de kanamicina.

3. Después de hacer crecer un número suficiente de células bacterianas en un caldo nutritivo que contiene kanamicina, estas células se rompen y el ADN plasmídico se purifica de los otros componentes de las células bacterianas.
4. Las moléculas de plásmido en forma de anillo se convierten en forma lineal usando un *enzima de restricción*, que escinde ambas hebras de la molécula de ADN en un sitio único y específico que se encuentra aguas abajo del gen de la proteína espiga. Este paso es necesario para evitar la formación de moléculas de ARN que son demasiado largas y pueden tener efectos no deseados in vivo.

Las moléculas de ADN linealizadas se pueden purificar de las circulares restantes, pero no es de conocimiento público de qué manera y con qué eficacia se puede hacer esto en la producción de las vacunas de Pfizer y Moderna.

5. Se usa una *ARN polimerasa*, en presencia de los cofactores y los bloques de construcción de nucleósidos necesarios para copiar el gen de la proteína espiga de la versión de ADN en el plásmido linealizado en la versión de ARNm. Tanto Pfizer como Moderna emplean la polimerasa de ARN T7, que se deriva del bacteriófago del mismo nombre. Esta enzima se une a una secuencia *promotora similar* igualmente derivada de T7 que se ha modificado en el plásmido antes del gen para la proteína de punta. Esta interacción entre la polimerasa y el promotor inicia la transcripción.

En esta etapa, el nucleósido sintético *N-metil-pseudouridina* (m $\psi$ U) se incorpora al ARN artificial en lugar del nucleósido de uridina natural. Cuando se administra en forma de vacuna, el ARN modificado de esta manera estimula menos el sistema inmunitario innato que el ARN que contiene la uridina natural. También se traduce más eficientemente en proteínas y, bajo ciertas condiciones, más resistencia a la degradación [1]. Tanto las vacunas de ARNm de Pfizer como las de Moderna contienen m $\psi$ U en lugar de uridina.

6. Los dos extremos de cada molécula de ARN se acoplan enzimáticamente a ciertos restos que también se encuentran en estas posiciones dentro de los ARNm de mamíferos naturales, y que mejoran su actividad biológica y estabilidad in vivo.

Estos pasos proporcionan un ARNm funcional que es capaz de instruir a los ribosomas de las células para que produzcan la proteína de espiga. Sin embargo, en esta etapa el producto aún no es puro: todo el ADN molde derivado de bacterias todavía está presente. Este último no debe incluirse en el producto farmacéutico final, porque presenta riesgos para la salud de los destinatarios (ver Sección 4). Para deshacerse de este ADN, se agrega otra enzima llamada *ADNasa*. Esto debería romper el ADN en fragmentos más pequeños, que luego se pueden eliminar de las moléculas de ARN mucho más grandes mediante filtración y otras técnicas de purificación. En el paso final, el ARNm se combina con una mezcla de lípidos para empaquetarlo en nanopartículas lipídicas (LNP), que inducen a las células humanas a tomar la molécula de ARNm y producir la proteína de espiga.

## **2 ¿Qué sabíamos previamente sobre el problema de la contaminación del ADN?**

En pocas palabras, muy poco. Los informes de evaluación de la FDA sobre ambas vacunas [2 ,3] no mencionan el problema en absoluto. El informe de evaluación de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) sobre la vacuna de Pfizer menciona que "la solidez del paso de digestión con *ADNasa* no se considera demostrada de forma exhaustiva" [4, pag. 17]. Se utiliza un lenguaje similar en el informe de la EMA sobre la vacuna Moderna [5, pag. 19f]. Sin embargo, basándose únicamente en esta escasa información, es imposible decir si el problema se consideró grave y qué remedios exigió el regulador, en su caso.

## **3 Evidencia independiente sobre la contaminación por ADN de productos de ARNm**

Al 3 de abril de 2023, Kevin McKernan describió sus hallazgos recientes en tres artículos en su Substack [6–8]. Los experimentos descritos en los dos primeros informes se llevaron a cabo en muestras de vacunas "bivalentes" recientemente introducidas por Pfizer y Moderna. Estas preparaciones se asemejan a las anteriores "monovalentes" en su composición química, es decir, deben contener ARNm de alta pureza, complejo con una mezcla de moléculas lipídicas (similares a la grasa) en ARNm/nanopartículas lipídicas. La única diferencia entre las dos variedades es que las vacunas bivalentes contienen una mezcla de dos ARNm que codifican dos variantes antigénicas de la proteína espiga. Esto no tiene nada que ver con el problema técnico de la contaminación del ADN como tal. Sin embargo, observamos que el alcance de la contaminación del ADN puede variar entre los lotes de producción, y que hasta ahora solo se ha caracterizado un pequeño número de lotes a este respecto.

**3.1 Primer informe de McKernan.** En un estudio inicial [6], McKernan caracterizó tanto el ARN como el ADN contenidos en las vacunas de ARNm.

**3.1.1 Extracción y caracterización directa de ácidos nucleicos de las vacunas.** El primer paso consistió en eliminar los lípidos para obtener los ácidos nucleicos puros. El método basado en solventes que utilizó no discrimina entre el ADN y el ARN: si ambos están presentes, ambos se recuperarán. Los ácidos nucleicos extraídos se separaron según el tamaño. Esto reveló no solo las especies de ARNm de espiga regulares y de longitud completa esperadas, sino también fragmentos más pequeños, que habían sido observados previamente tanto por los reguladores como en el trabajo publicado por uno de los fabricantes. [9]. Más sorprendentemente, también se encontraron especies de ARN más grandes que el ARNm de longitud completa. Estas especies permanecen sin caracterizar.

**3.1.2 Amplificación de los ácidos nucleicos extraídos.** Como paso preparatorio para determinar las secuencias de nucleótidos exactas de los ácidos nucleicos extraídos, se amplificaron mediante métodos de PCR. En el caso del ARN, la PCR fue precedida por la transcripción inversa en ADN usando una enzima específica (transcriptasa inversa). Dado que el objetivo principal de este estudio era estudiar el ARN en lugar del ADN, este paso de amplificación se sesgó contra el ADN mediante la adición de actinomicina D, que en las condiciones experimentales dadas inhibe selectivamente la síntesis de ADN. En consecuencia, se recuperaron cantidades relativamente bajas de ADN en la muestra amplificada. Sin embargo, en el caso de la vacuna de Pfizer, la cantidad de ADN que se determinó que estaba presente ya excedía el límite arbitrariamente decidido por la EMA para la proporción máxima permisible de ADN por ARN.

**3.1.3 Resultados de la secuenciación del ADN.** Tanto con los productos de Pfizer como con los de Moderna, se obtuvieron secuencias de ADN de plásmidos de ADN completos, aunque permaneció cierta ambigüedad en el caso de los plásmidos de Moderna. Por lo tanto, las características de las secuencias de plásmidos se discutirán en relación con el segundo estudio de McKernan, que usó cada vez más ADN puro para la secuenciación y, por lo tanto, proporcionó resultados más confiables.

**3.2 Segundo informe de McKernan.** El segundo estudio [7] se centró en cuantificar y caracterizar la contaminación de ADN que se detectó cualitativamente en el primero.

**3.2.1 El ADN plasmídico contenido en las vacunas de ARNm es competente para propagarse en células bacterianas.** En el primer experimento, se determinó si el ADN plasmídico cuya presencia se había inferido a partir de los resultados de la secuenciación previa es efectivamente biológicamente funcional, en la medida en que pueda introducirse y persistir dentro de las células bacterianas. Con este fin, los ácidos nucleicos se extrajeron nuevamente de las muestras de vacunas. Estos ácidos nucleicos se mezclaron con una suspensión de células de *E. coli* que habían sido procesadas para la captación de ADN *competente*.

Después de inducir a estas células a tomar el ADN y darles algo de tiempo para que se recuperaran, se extendieron sobre placas de Petri llenas de medio de crecimiento solidificado que contenía

kanamicina. Como se señaló anteriormente, la kanamicina matará cualquier célula *E. coli* que no contenga un gen de resistencia a ella. Por lo tanto, el crecimiento observado de colonias de bacterias en esas placas de Petri confirmaron que algunas células habían adquirido resistencia a la kanamicina al absorber y propagar los plásmidos. Esto se observó con las muestras de vacunas de Pfizer y Moderna.

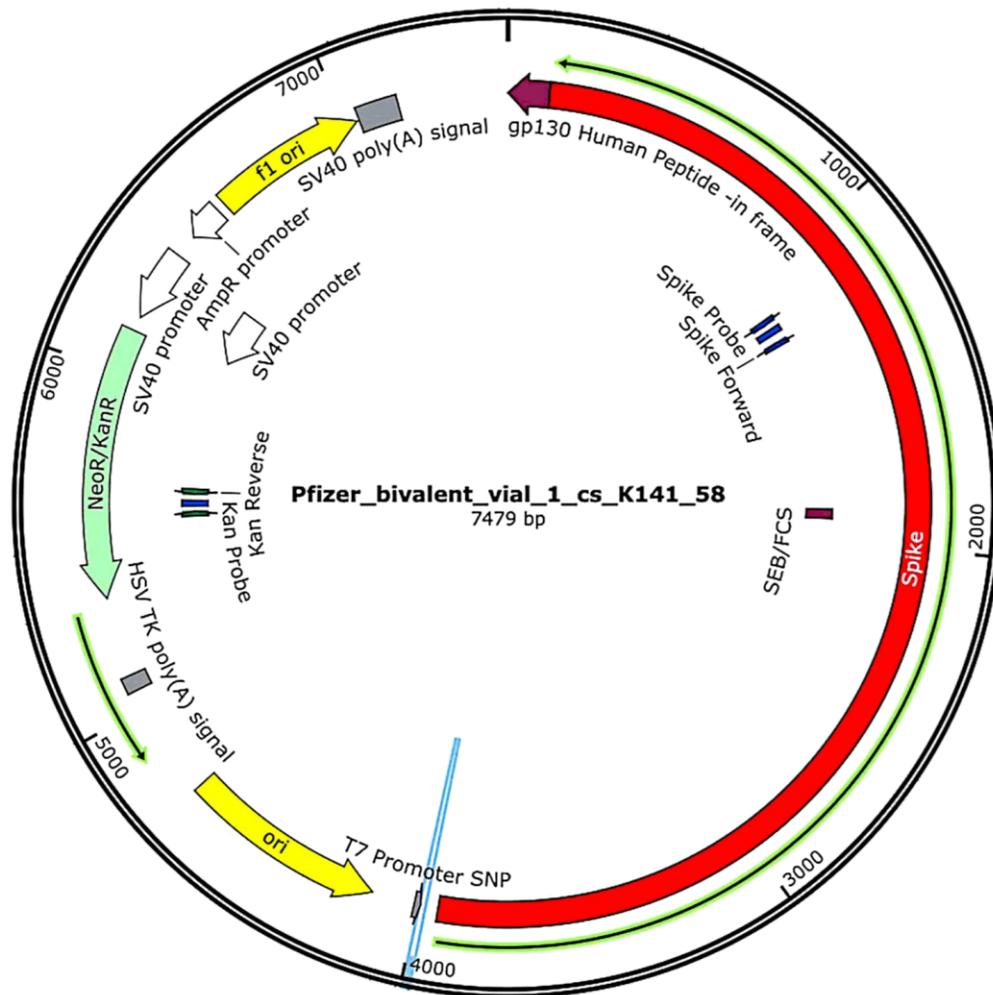
En este contexto, debemos señalar que solo las moléculas de plásmido circulares, pero no las linealizadas, pueden introducirse de manera eficiente en las células bacterianas. Por lo tanto, el éxito de este experimento sugiere que algunas de las moléculas del plásmido habían escapado al paso de linealización (paso 4 en la Sección 1.2) y lo hizo durante todo el proceso de producción en la forma circular que existe en las células bacterianas. Por otro lado, dado que el número de colonias bacterianas observadas en este experimento no fue alto, es probable que la mayor parte del ADN se haya linealizado. Debido a que los peligros biológicos del ADN extraño dentro de nuestro propio cuerpo pueden variar dependiendo de si es lineal o circular, vale la pena señalar la presencia probable de ambas formas en las vacunas. Quedan por determinar las proporciones exactas de ADN circular y lineal en las mezclas.

**3.2.2 La abundancia de ADN contaminante** .El segundo hallazgo importante de este estudio es la cuantificación por PCR tanto del ADN como del ARNm contenidos en las muestras de vacunas. Como sabrá, en una reacción de PCR, un segmento elegido de una secuencia de ácido nucleico se duplica mediante síntesis enzimática en varios ciclos de reacción sucesivos. A partir del número de ciclos (o duplicaciones) necesarios para alcanzar un cierto umbral de concentración, podemos calcular cuántas copias de la secuencia objetivo estaban presentes al principio.

En estos experimentos, el formato experimental elegido fue *PCR múltiplex*, es decir, se amplificaron dos secuencias diana en una única mezcla de reacción. Uno de estos objetivos estaba dentro del gen de la proteína de punta y, por lo tanto, debería estar presente tanto en las moléculas de ADN del plásmido como en las moléculas de ARNm de la espiga transcritas a partir de ellas. Para incluir las moléculas de ARNm en esta amplificación, la PCR fue nuevamente precedida por la transcripción inversa.

La otra secuencia objetivo estaba dentro del gen de resistencia a la kanamicina, que debería estar presente solo en el ADN del plásmido. Al comparar el número de ciclos necesarios para que cada uno de los dos objetivos cruce el umbral, se determinó que hasta el 35% del ácido nucleico total contenido en las vacunas es, de hecho, ADN. A modo de comparación, la EMA ha estipulado que el ADN no debe representar más del 0,033% del total de ácidos nucleicos.

**3.2.3 Determinación de secuencias de ADN plasmídico**. Los plásmidos que originalmente estaban contenidos en las vacunas y luego se introdujeron en las células bacterianas (consulte la Sección 3.2.1) se aislaron nuevamente de esos cultivos bacterianos y se determinaron sus secuencias completas de ADN. Tales secuencias se proporcionaron en su totalidad en el primer estudio de McKernan [6], pero indicó que todavía estaba trabajando para corroborar y refinar los datos de secuenciación. Mientras tanto, las características funcionales del ADN plasmídico encontrado en las muestras de vacunas de Pfizer se muestran en la Figura 1. Se discutirán en relación con la evaluación de riesgos.



**Figura 1** Mapa del ADN plasmídico contenido en uno de los viales de vacuna bivalente de Pfizer. Las características funcionales se deducen de la secuencia de ADN determinada experimentalmente. El gen que codifica la proteína espiga (rojo), cuya transcripción está impulsada por el promotor T7, representa aproximadamente la mitad de la secuencia total del ADN. El gen “NeoR/KanR” (verde claro) codifica una proteína que hará que las células bacterianas sean resistentes a la kanamicina o la neomicina, o que las células humanas sean resistentes al antibiótico relacionado G418. La secuencia amarilla etiquetada como "ori" es el origen bacteriano de la replicación; hará que se hagan copias del plásmido dentro de la célula bacteriana. Los elementos derivados de SV40 en la parte superior izquierda pueden inducir la expresión de resistencia a G418 en células humanas y también incluyen un origen de replicación que puede provocar la propagación del plásmido en células humanas. Están ausentes en los plásmidos de Moderna, que por lo demás son similares a los de Pfizer. Ver el texto para más detalles. Figura adaptada de [7].

**3.3 Tercer informe de McKernan.** En su último informe hasta el momento, McKernan examinó ocho viales de un lote anterior de la vacuna de Pfizer utilizando el método de PCR cuantitativo descrito anteriormente. El contenido de ADN en este caso fue notablemente más bajo que con las muestras de vacunas bivalentes, pero aun así superó el límite de EMA por un factor de 18-70 [ 8].

## 4 Evaluación de riesgos

Debemos suponer que el ADN recombinante que se encuentra en las vacunas de ARNm se puede introducir en las células de nuestro cuerpo, y que esto se verá favorecido por la nanopartículas de lípidos, tal como es el caso con el propio ARNm. Esto plantea varios tipos diferentes de riesgos para la salud.

**4.1 Duración extendida de la expresión de la proteína de espiga.** Un argumento clave que se usa regularmente para promover la percepción de la seguridad de la vacuna de ARNm es que el ARNm es de corta duración in vivo y que, por lo tanto, la expresión del antígeno codificado también será de corta duración. Por ejemplo, el informe de evaluación de la EMA sobre los estados de la vacuna de Pfizer, con respecto a los experimentos con animales en una vacuna modelo que se aceptaron en lugar de los estudios adecuados sobre la vacuna COVID-19 real [4, pag. 46]:

*Como se esperaba con un producto de ARNm, la expresión de la luciferasa fue transitoria. . . La señal disminuyó lentamente durante las primeras 72 horas y después de 6 y 9 días las señales se debilitaron aún más a niveles de aproximadamente 18 y 7 veces las señales obtenidas de animales inyectados con tampón de control.*

Estos hallazgos parecen estar de acuerdo con dos estudios in vitro que compararon la duración de la expresión de proteínas entre especies de ARN mensajero, que eran idénticas en secuencia pero contenían uridina o m $\psi$ U, respectivamente; como se señaló anteriormente, este último también está presente en las vacunas de ARNm de Pfizer y Moderna. En ambos estudios [1,10], las especies de ARN modificadas con m $\psi$ U indujeron niveles significativamente más altos de expresión de proteínas, pero, sin embargo, esta expresión elevada disminuyó con una vida media similar a la del ARN no modificado. Ninguna de las vidas medias que pueden deducirse de los datos en cualquiera de los estudios supera los 4,5 días.

Sin embargo, está claro a partir de múltiples estudios en individuos vacunados que tanto la proteína espiga como los ácidos nucleicos que la codifican pueden detectarse, en el torrente sanguíneo y en varios órganos, durante semanas e incluso meses después de la inyección. [11–15]. Esta discrepancia entre los estudios in vitro e in vivo hasta ahora ha sido difícil de entender. Los altos niveles de ADN plásmido residual en las vacunas detectadas por McKernan ahora sugieren una explicación plausible.

Para que el ADN del plásmido bacteriano admita la expresión prolongada de la proteína espiga, deben cumplirse dos condiciones:

1. el ADN plásmido debe persistir dentro de las células de nuestro cuerpo, y
2. el gen de la proteína espiga en ese plásmido debe ser transcrito en ARNm por nuestra propia ARN polimerasa II celular.

Si bien aún no tenemos datos experimentales directos sobre los plásmidos de expresión de espigas de Pfizer y Moderna, el precedente sugiere que, de hecho, se cumplen ambos requisitos. Se ha descubierto que los plásmidos recombinantes que expresan el factor IX de la

coagulación persisten en las células hepáticas de los animales de experimentación en niveles estables durante un máximo de 1,5 años. [16,17], que fue la duración total del experimento. Se podría objetar que los plásmidos utilizados en estos estudios eran circulares, mientras que la mayor parte del ADN plasmídico contenido en las vacunas de ARNm probablemente se encuentra en forma lineal (consulte la Sección 1.2). En respuesta, observamos que, en primer lugar, es probable que quede algo de ADN plásmido circular (consulte la Sección 3.2.1) y, en segundo lugar, que se ha demostrado que el ADN viral recombinante persistirá en forma lineal dentro de los animales durante períodos de tiempo igualmente largos [18], lo que sugiere que lo mismo puede ocurrir con el ADN plasmídico.

En los estudios citados [16,17], el gen que codifica la proteína de interés (factor IX) había estado bajo el control de un promotor de mamífero y, de hecho, la proteína del factor IX se expresó a niveles estables en todo momento. Por el contrario, el gen de la proteína espiga contenido en los plásmidos de expresión de Pfizer y Moderna está bajo el control de un promotor del bacteriófago T7. No podemos suponer a priori que este promotor funcionará en ausencia de su ARN polimerasa T7 afín. Sin embargo, se ha confirmado experimentalmente que, de hecho, el promotor T7 también se une a la ARN polimerasa II celular y provoca la expresión de proteínas en células de mamíferos. [19].

En resumen, la posibilidad de que la expresión de larga duración observada de la proteína espiga sea causada por el ADN plasmídico contenido en las vacunas de ARNm debe tomarse en serio. La persistencia prolongada del ARNm de la proteína espiga y su expresión después de la vacunación, detectada en biopsias y autopsias, se ha relacionado inequívocamente con daños graves. [14,20], que probablemente esté mediado por un ataque inmunitario a las células que expresan este antígeno extraño. La omisión de los estudios experimentales correspondientes en la etapa de ensayos preclínicos, junto con la escala de esta contaminación, crea un riesgo de seguridad del todo inaceptable.

**4.2 Riesgos asociados con las secuencias de ADN reguladoras derivadas de SV40** .Una característica que fue identificada por McKernan en los plásmidos de expresión de Pfizer pero no en los de Moderna [6] es un promotor derivado del virus SV40, que pertenece a la familia de los poliomavirus (ver Sección 4.2). Este promotor se encuentra aguas arriba del gen de resistencia a la kanamicina; y dado que es activo en células de mamíferos, la proteína codificada por este gen de resistencia se expresará en cualquier célula que contenga este ADN. Al igual que la proteína espiga, esta proteína es un antígeno extraño y, por lo tanto, también puede desencadenar un ataque inmunitario en las células que la expresan.

El promotor SV40 también incluye un origen interno de replicación que potencialmente puede causar que se hagan copias del plásmido dentro de las células de mamíferos. [21]. Esto requerirá la presencia del *antígeno T grande* vírico, una proteína que reconoce directamente este origen y luego inicia la replicación de la molécula de ADN. Esta proteína no está codificada por el plásmido, ni está normalmente presente en las células de nuestro cuerpo, pero podría ser suministrada por el propio virus SV40 o por un poliomavirus relacionado. Una minoría de la población humana está infectada de forma latente con SV40, y dicha infección latente está

asociada con algunas enfermedades malignas y no malignas [22]. Si se toma una copia del plásmido de Pfizer en una célula que alberga SV40, es posible que se formen copias adicionales.

Dos virus polioma relacionados que están mucho más extendidos en la población humana son el virus BK y el virus JC. [23,24]. El antígeno T JC grande aparentemente es menos efectivo junto con el origen de SV40 que la propia proteína de SV40. [25], pero no se puede descartar, sin embargo, la replicación del plásmido de Pfizer en células infectadas de forma latente por virus JC o BK. Copias adicionales del plásmido generado en esta manera amplificaría todos los otros riesgos discutidos en esta sección, con la posible excepción de inflamación no específica (ver Sección 4.4).

**4.3 Inserción genómica del ADN plasmídico** .Los escenarios discutidos hasta ahora involucran a los independientes persistencia *episómica* del ADN plasmídico; estará presente cerca de los cromosomas (dentro del núcleo celular), pero no se habrá convertido en parte integral de ninguno de ellos. Estas moléculas de plásmido independientes y no replicantes tenderán a perderse durante la división celular. [26]. Sin embargo, como veremos, en algunos casos una molécula de plásmido puede integrarse en uno de los cromosomas de su célula huésped y luego será heredada por todos los descendientes de esa célula.

La integración cromosómica es una forma de “genotoxicidad”, es decir, toxicidad que causa daño genético. Con respecto a la posibilidad de tales efectos, el informe de evaluación de la EMA sobre la vacuna de ARNm de Pfizer señala sucintamente [4, pag. 50]:

*No se han proporcionado estudios de genotoxicidad. Esto es aceptable ya que los componentes de la formulación de la vacuna son lípidos y ARN que no se espera que tengan potencial genotóxico.*

Aparentemente, los expertos de la EMA suponían que el ARN en general no afectaría la integridad del genoma de la célula huésped. Este punto de vista es incorrecto, y la primera evidencia para demostrarlo ha celebrado recientemente su quincuagésimo aniversario [27]. Sin embargo, la detección de copiosas cantidades de ADN plasmídico en las vacunas de ambos fabricantes ahora obvia la necesidad de presentar ese caso. Seguramente, incluso los científicos de la EMA sabrán que este ADN puede integrarse en el genoma de las células huésped humanas. No se necesitan características de secuencia específicas para que ocurra tal integración y, en consecuencia, se ha observado de manera similar con el ADN de virus, bacteriófagos y plásmidos de mamíferos. [28]. Vale la pena señalar que tales inserciones pueden ocurrir en ubicaciones aleatorias del genoma, pero los genes que se expresan activamente en la célula se ven afectados con mayor frecuencia. [29].

La integración cromosómica estable de un plásmido bacteriano en el ADN cromosómico de células de mamíferos se demostró ya en 1982. [30]. El plásmido en cuestión comparte múltiples características con los utilizados en la producción de vacunas de ARNm de Moderna y Pfizer. La introducción de genes extraños o modificados en células de mamífero utilizando esta y otras técnicas similares se ha convertido desde entonces en un lugar común en la investigación experimental y en la biotecnología. La metodología se denomina *transfección*, y

los organismos modificados de esta manera como *transgénico*. Observamos que la integración estable puede ocurrir con ADN de plásmido tanto lineal como circular [31].

En este contexto, también debemos considerar el estudio previamente publicado por Aldén et al. [32], que detectó copias de ADN del gen de la proteína espiga en una línea celular de hígado humano después de que estas células se hubieran expuesto a la vacuna de ARNm de Pfizer. Basándose en la suposición de que la vacuna contenía ARNm esencialmente puro pero no ADN, tomaron esta observación como evidencia de que el ARNm sintético había sufrido una transcripción inversa dentro de esas células. Su interpretación es plausible, porque se sabe que dicha transcripción inversa ocurre en principio, y previamente se ha informado en células de pacientes infectados con el virus SARS-CoV-2 [33]. Sin embargo, a la luz del descubrimiento de McKernan de que los viales de vacunas de Pfizer pueden contener cantidades sustanciales de ADN, parece igualmente posible que las observaciones de Aldén et al. indicaba simplemente la captación celular de este ADN. Sin embargo, de cualquier manera, sus hallazgos indican la presencia de ADN que codifica espigas dentro de esas células, lo que indica un riesgo de inserción genómica.

**4.3.1 Inserción genómica en terapia génica utilizando vectores retrovirales** .En una terapia génica adecuada, a menudo se desea la integración cromosómica, ya que corregirá el defecto genético en cuestión de forma duradera. Con este fin, se han desarrollado vectores de ADN especiales que tienen una propensión mucho mayor a sufrir dicha integración. Estos vectores se derivan de *retrovirus*, cuya toda estrategia de supervivencia se basa en la integración genómica. Sin embargo, resulta que la integración, cuando ocurre en el lugar equivocado dentro del genoma, frecuentemente induce enfermedades malignas, especialmente leucemia. [34]. De hecho, esto es tan común que ha impedido la adopción generalizada de la terapia génica, incluso en enfermedades para las que todas las demás opciones terapéuticas también están cargadas de riesgos muy graves. Un buen ejemplo es la deficiencia de adenosina desaminasa, una enfermedad metabólica que acaba con los linfocitos y, por lo tanto, provoca una inmunodeficiencia combinada grave (SCID), una condición que sin tratamiento siempre es fatal durante la infancia. Esta enfermedad es, en principio, un objetivo muy adecuado para la terapia génica, sin embargo, un trasplante de médula ósea de un donante compatible y emparentado sigue siendo la opción terapéutica preferida, debido al grave riesgo de neoplasias malignas inducidas por la terapia génica. [35].

**4.3.2 ¿Cómo la inserción genómica causa tumores malignos?** Nuestro genoma contiene múltiples genes que pueden dar lugar a cáncer si su nivel de expresión (la velocidad a la que se sintetizan las moléculas de ARNm y proteínas a partir de ellos) es demasiado bajo o demasiado alto. Es posible que una molécula de ADN extraño se inserte directamente en dicho gen y lo elimine por completo, o puede insertarse junto a él, y un promotor fuerte presente en ese ADN extraño puede causar una expresión excesiva del gen en cuestión. Además, se ha observado que los eventos de inserción también pueden causar cambios en la metilación del ADN en todo el genoma, lo que afectará a los niveles de expresión de muchos genes; y algunos de estos

cambios pueden contribuir a la inducción de malignidad. Es importante destacar que este efecto se ha visto no solo con el ADN viral sino también con plásmidos bacterianos. [36].

Cuando las células se aíslan de un órgano humano o animal sano y se cultivan en cultivo celular, se dividirán durante un número limitado de generaciones y luego morirán. Por el contrario, las células derivadas de tumores malignos y leucemias pueden propagarse indefinidamente. También puede ocurrir un cambio similar en las células cultivadas, que por lo tanto se immortalizan y, por lo general, también pierden algunas características que son características de su tejido de origen. Esta *transformación* puede inducirse, por ejemplo, infectando las células con el virus SV40 antes mencionado. De manera similar, las células pueden transformarse por transfección con un plásmido derivado de SV40 que retiene las partes cruciales del genoma viral, incluido el gen que codifica el antígeno T grande. Por otro lado, si falta el antígeno T grande en el plásmido, la transformación no suele ocurrir. [30]. Sin embargo, se han reportado algunas excepciones [37,38]. Estos casos deben haber surgido de la alteración o desregulación de los genes celulares implicados en el control de la proliferación.

**4.3.3 Integración genómica en células germinales** .Los ovocitos se pueden transfectar in vivo en ciertas etapas de maduración. [39], al igual que las células productoras de espermatozoides dentro de los testículos [40]. En este último caso, se demostró que las crías de los animales sometidos a dicho tratamiento eran transgénicas. Por lo tanto, no se puede descartar que las personas inyectadas con vacunas de ARNm que también contienen ADN den a luz posteriormente a niños transgénicos. La inserción de ADN en las células de la línea germinal también podría interferir con el desarrollo intrauterino temprano y, por lo tanto, inducir abortos espontáneos o malformaciones.

**4.3.4 ¿Cómo debemos evaluar el riesgo de la inserción genómica?** Ciertamente es cierto que los plásmidos bacterianos tienen una menor propensión a insertarse en nuestro ADN cromosómico que los vectores de terapia génica especialmente diseñados para una integración eficaz. Pero, ¿cuán grande es exactamente el riesgo en el caso de los plásmidos contenidos en las vacunas de ARNm? La respuesta simple es que nadie lo sabe. Esto no se debe a que en principio sea incognoscible, sino a que no se realizaron los estudios experimentales apropiados en animales y, posteriormente, en humanos; o si se hicieron, los resultados se han ocultado al público, y aparentemente también a los reguladores.

¿Cómo se evaluarían tales riesgos en los procedimientos de aprobación llevados a cabo correctamente? La guía actual de la FDA sobre la prueba y aprobación de terapias génicas [41] recomienda que, en la etapa de prueba clínica, los pacientes sean monitoreados durante 15 años completos después de la administración, con exámenes anuales durante los primeros cinco años. Esto se aplica a los vectores con los que se pretende la inserción cromosómica. El documento de orientación continúa construyendo una falsa dicotomía entre vectores de inserción y no inserción, pero la línea divisoria entre ellos sigue siendo borrosa. Por un lado, la guía sugiere que:

*Productos de GT [terapia génica] que se basan en vectores como los plásmidos. . . no tienen una propensión a integrarse o reactivarse después de la latencia, generalmente presentan un menor riesgo de eventos adversos tardíos,*

pero por otro lado dice que

*cambios en los métodos utilizados para introducir vectores de ADN plasmídico en las células. . . resultan en frecuencias de integración más altas (Ref. 27).*

La referencia citada en la última cita es un estudio de Wang et al. [42], quienes identificaron inequívocamente la inserción de ADN de plásmido de ADN in vivo después de la inyección intramuscular, seguida de electroporación. Si bien la electroporación aumentó la captación celular del ADN inyectado en relación con la inyección de ADN "desnudo", probablemente fue mucho menos eficaz en este sentido de lo que lo serían las nanopartículas de lípidos contenidas en las vacunas de ARNm. En consecuencia, debemos esperar cierto grado de integración cromosómica del ADN del plásmido contaminante in vivo.

**4.4 Efecto proinflamatorio del ADN bacteriano** .El sistema inmunológico innato humano reacciona con inflamación a varias macromoléculas bacterianas, incluido el ADN. Se debe suponer que las grandes cantidades de ADN presentes en las vacunas contribuyen a la inflamación cerca del lugar de la inyección y, potencialmente, también en otras partes del cuerpo.

## **5. Conclusión**

La presencia de ADN plasmídico contaminante en las vacunas de ARNm de Pfizer y Moderna conlleva graves riesgos para la salud, además de los ya conocidos y entendidos. Preeminente entre estos riesgos está la expresión prolongada de la proteína espiga, que puede conducir a una inflamación de tipo autoinmune correspondientemente prolongada y más destructiva, y la inducción de una enfermedad maligna después de la integración cromosómica del ADN del plásmido. Además, la magnitud de la contaminación demuestra de manera concluyente que los fabricantes no han dominado o implementado correctamente los procesos de producción diseñados. Cada uno de estos temas por sí solo sería motivo suficiente para exigir la retirada inmediata de estas vacunas.

## **Agradecimientos**

Agradecemos a Kevin McKernan y Ulrike Kämmerer por las correcciones y el debate.

## **Derechos de autor**

Este texto tiene licencia bajo los términos de Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0). Esto significa que eres libre de copiar y reutilizar el contenido, siempre que se acredite a los autores originales. Si realiza cambios en el texto, debe indicarlo explícitamente. Para obtener más información, consulte el sitio web de Creative Commons [43].

## Referencias

- [1] O. Andries et al.: N<sup>1</sup>-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J. Control.Release* 217 (2015), 337–344. pmid: [26342664](#).
- [2] Anonymous: *FDA briefing document: Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine*. 2020. url: <https://www.fda.gov/media/144245/download>.
- [3] Anonymous: *FDA briefing document: Moderna MRNA-1273*. 2020. url: <https://www.fda.gov/media/144452/download>.
- [4] Anonymous: *EMA Assessment report: Comirnaty*. 2021. url: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf).
- [5] Anonymous: *EMA Assessment report: COVID-19 Vaccine Moderna*. 2021. url: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf).
- [5] K. McKernan: *Deep sequencing of the Moderna and Pfizer bivalent vaccines identifies contamination of expression vectors designed for plasmid amplification in bacteria*. 2023. url: <https://anandamide.substack.com/p/curious-kittens>.
- [6] K. McKernan: *Pfizer and Moderna bivalent vaccines contain 20-35expression vector and are transformation competent in E.coli*. 2023. url: <https://anandamide.substack.com/p/pfizer-and-moderna-bivalent-vaccines>.
- [7] K. McKernan: *DNA contamination in 8 vials of Pfizer monovalent mRNA vaccines*.2023. url: <https://anandamide.substack.com/p/dna-contamination-in-8-vials-of-pfizer>.
- [8] H. K. Patel et al.: Characterization of BNT162b2 mRNA to Evaluate Risk of Off-Target Antigen Translation. *J. Pharm. Sci.* (2023). pmid: [36642376](#).
- [9] N. Pardi et al.: Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *J. Exp. Med.* 215 (2018), 1571–1588. pmid:[29739835](#).
- [10] S. Bansal et al.: Cutting Edge: Circulating Exosomes with COVID Spike Protein Are Induced by BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) Vaccination prior to Development of Anti-bodies: A Novel Mechanism for Immune Activation by mRNA Vaccines. *J. Immunol.* 207 (2021), 2405-2410. pmid: [34654691](#).
- [11] J. A. S. Castruita et al.: SARS-CoV-2 spike RNA vaccine sequences circulate in blood up to 28 days after COVID-19 vaccination. *APMIS* 131 (2023), 128–132. pmid: [36647776](#).
- [12] T. E. Fertig et al.: Vaccine mRNA Can Be Detected in Blood at 15 Days Post-Vaccination. *Biomedicines* 10 (2022), 1538. pmid: [35884842](#).
- [13] E. Magen et al.: Clinical and Molecular Characterization of a Rare Case of BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine-Associated Myositis. *Vaccines* 10 (2022). pmid: [35891299](#).
- [14] K. Röltgen et al.: Immune imprinting, breadth of variant recognition and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell* (2022). pmid:[35148837](#).
- [15] C. H. Miao et al.: Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer in vivo. *Mol. Ther.* 3 (2001), 947–57. pmid:[11407909](#).

- [16] X. Ye et al.: Complete and sustained phenotypic correction of hemophilia B in mice following hepatic gene transfer of a high-expressing human factor IX plasmid. *J. Thromb. Haemost.* 1 (2003), 103–11. pmid: [12871546](#).
- [17] L. Jager and A. Ehrhardt: Persistence of high-capacity adenoviral vectors as replication-defective monomeric genomes in vitro and in murine liver. *Hum. Gene Ther.* 20 (2009), 883–96. pmid: [19364285](#).
- [18] Y. Q. Li et al.: [The function of T7 promoter as cis-acting elements for polymerase II in eukaryotic cell]. *Yi Chuan Xue Bao* 27 (2000), 455–61. pmid: [10979193](#).
- [20] M. Mörz: A Case Report: Multifocal Necrotizing Encephalitis and Myocarditis after BNT162b2 mRNA Vaccination against Covid-19. *Vaccines* 10 (2022), 2022060308. doi: [10.3390/vaccines10101651](#).
- [21] B. J. Byrne et al.: Definition of the simian virus 40 early promoter region and demonstration of a host range bias in the enhancement effect of the simian virus 40 72-base-pair repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 (1983), 721–5. pmid: [6298771](#).
- [22] J. C. Rotondo et al.: Association Between Simian Virus 40 and Human Tumors. *Front. Oncol.* 9 (2019), 670. pmid: [31403031](#).
- [23] J. A. DeCaprio and R. L. Garcea: A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (2013), 264–76. pmid: [23474680](#).
- [24] I. Hussain et al.: Human BK and JC polyomaviruses: Molecular insights and prevalence in Asia. *Virus Res.* 278 (2020), 197860. pmid: [31911182](#).
- [25] F. La Bella and H. L. Ozer: Differential replication of SV40 and polyoma DNAs in Chinese hamster ovary cells. *Virus Res.* 2 (1985), 329–44. pmid: [2994312](#).
- [26] A. Ehrhardt et al.: Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle in vivo. *J. Virol.* 77 (2003), 7689–95. pmid: [12805471](#).
- [27] D. Baltimore: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226 (1970), 1209–11. pmid: [4316300](#).
- [28] W. Doerfler: Beware of manipulations on the genome: epigenetic destabilization through (foreign) DNA insertions. *Epigenomics* 8 (2016), 587–91. pmid: [26997469](#).
- [29] W. Doerfler: A new concept in (adenoviral) oncogenesis: integration of foreign DNA and its consequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1288 (1996), F79–99. pmid: [8876634](#).
- [30] P. J. Southern and P. Berg: Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982), 327–41. pmid: [6286831](#).
- [31] G. Stuchbury and G. Münch: Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA. *Cytotechnology* 62 (2010), 189–94. pmid: [20424915](#).
- [32] M. Aldén et al.: Intracellular Reverse Transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 In Vitro in Human Liver Cell Line. *Curr. Issues Mol. Biol.* 44 (2022), 1115–1126. pmid: [35723296](#).
- [33] L. Zhang et al.: SARS-CoV-2 RNA reverse-transcribed and integrated into the human genome. *bioRxiv* (2020). doi: [10.1101/2020.12.12.422516](#).
- [34] F. J. T. Staal et al.: Sola dosis facit venenum. Leukemia in gene therapy trials: a question of vectors, inserts and dosage? *Leukemia* 22 (2008), 1849–1852. pmid: [18769449](#).

- [35] D. B. Kohn and H. B. Gaspar: How We Manage Adenosine Deaminase-Deficient Severe Combined Immune Deficiency (ADA SCID). *J. Clin. Immunol.* - (2017), n/a.
- [36] W. Doerfler et al.: Inheritable epigenetic response towards foreign DNA entry by mammalian host cells: a guardian of genomic stability. *Epigenetics* 13 (2018), 1141–1153. pmid: [30458693](#).
- [38] R. Sipehia and G. Martucci: High-efficiency transformation of human endothelial cells by Apo E-mediated transfection with plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214 (1995), 206–11. pmid: [7669041](#)
- [39] M. Takahashi et al.: Transformation of MC3T3-E1 cells following stress and transfection with pSV2neo plasmid. *Anticancer Res.* 22 (2002), 585–98. pmid: [12014626](#).
- [40] A. Laurema et al.: Transfection of oocytes and other types of ovarian cells in rabbits after direct injection into uterine arteries of adenoviruses and plasmid/liposomes. *Gene Ther.* 10 (2003), 580–4. pmid: [12646863](#).
- [41] S. Dhup and S. S. Majumdar: Transgenesis via permanent integration of genes in repopulating spermatogonial cells in vivo. *Nat. Methods* 5 (2008), 601–3. pmid: [18552853](#).
- [42] Anonymous: *Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products: Guidance for Industry*. 2020. url: <https://www.fda.gov/media/113768/download>.
- [43] Z. Wang et al.: Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther.* 11 (2004), 711–21. pmid: [14724672](#).
- [44] Anonymous: *Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)*.2023. url: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.