



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CONSECUENCIAS DE LA TRANSFERENCIA
HORIZONTAL DE GENES EN LA EVOLUCIÓN
GENÓMICA EUKARIOTE**

SEMINARIO DE TITULACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ DARÍO MARTÍNEZ EZQUERRO



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

**TUTORA
DRA. ALEJANDRA VÁZQUEZ LOBO YURÉN
2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Martínez
Ezquerro
José Darío
53 96 95 83
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099581178

2. Datos del tutor

Dra.
Alejandra
Vázquez Lobo
Yurén

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Daniel Ignacio
Piñero
Dalmau

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Arturo Carlos II
Becerra
Bracho

5. Datos del sinodal 3

Dr.
León Patricio
Martínez
Castilla

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Lev Orlando
Jardón
Barbolla

7. Datos del trabajo escrito

Consecuencias de la transferencia horizontal de genes en la evolución genómica eucarionte
123 p
2010

En memoria de mi Guti
Biól. Rosa María Kamffer González

Dedicado a mi madre
M. en C. Rosa María Ezquerro Kamffer

Agradecimientos

A mis padres por todo su apoyo y cariño incondicional, por sus consejos y paciencia, por las nutridas discusiones y enseñanzas, por tantas cosas... para ustedes y por ustedes existe este trabajo.

A mi familia por ser ejemplo de lucha, inspiración y tenacidad, siempre con alegría y disfrute de la vida. Particularmente a mi hermanakaktus por su continua superación, independencia y disposición para ayudar.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser para mi, la mejor universidad del mundo.

A la Facultad de Ciencias y sus docentes por conjuntar un excelente espacio de enseñanza con docentes comprometidos con la formación de biólogos.

A la Dra. Alejandra Vázquez Lobo Yurén por aceptar ser mi asesora para la realización de este trabajo. Por su comprensión, compromiso y empatía, así como su guía, ayuda e interés para el logro de mi titulación y continuidad académica, pero sobre todo por su amistad.

A mis sinodales, el Dr. Daniel Piñero, Dr. Arturo Becerra, Dr. León Patricio Martínez y Biól. Lev Jardón, quienes amablemente realizaron la lectura crítica de este trabajo, comentando y sugiriendo modificaciones constructivas para su mejora y proyección.

Al Profr. Alfredo Alejandro Martínez Peñaloza, porque sus palabras al finalizar el primer semestre de la carrera fueron determinantes para que continuara en Biología.

A la familia Hernández Marco por brindarme su confianza, apoyo y cariño. Muchas gracias por formar parte de mi familia extendida.

A la Biotecnól. Cecilia Zampedri por apoyarme y discutir este trabajo, pero sobre todo por su cariño, comprensión y alegre compañía.

Al Instituto Nacional de Cancerología y amigos: Luis Alonso, Tzutzuy, Caty, Enrique, Lucy, Carlos, Alma, Olguita, Silvia, Aurora, Alicia, Marifer, Lupita, Miguel, Marco, Lisandro, Julia, por permitirme acceder al INCAN, presentarme una línea de investigación sensacional, discutir conmigo sus conocimientos y compartir vivencias personales.

A todos con quienes he compartido esta etapa de mi vida y que han hecho que este trayecto sea inolvidable: amigos de la Facultad de Química; de la Facultad de Ciencias y del Tango; Alonso, Chou, Jessica, Marisol, Pedro, Raúl, Karla, Laila, Paty y familia, Rodrigo, Marianita y familia, Paola, Compatriot, Mau, Miryam, Bere, Las Caros, Víctor, Arturo, Rolando, Kiks, Poncho, Adrián, Jaime, Amaranthum, Leslie, Amiel, Daniela, Octavio, Linda, Mel, Cris, Daniel, Cenía, Berta, Jess, Yazz, Kristell, Karlita, Astrid, Hallynee, Chui, Anita, Vane, Toño, Andrés, Quique, Álvaro, Lindsay, Ofé, Gaby, Ainara, Loli y Norma, Liliana, Erita, Salomón, Citlali, Lizeth, Marcela, Nayeli, Paulina, Valeria, Valesa, Freddy, Kris, Mariana, Lilili, Silvia, María, Severo, Diana. Anticipo una disculpa porque seguramente por mi mala memoria he omitido a alguien ¡ja!

Finalmente, al tango y a las tangueras, que aunque han hecho un poco más lenta la culminación de esta etapa, me han acompañado gratamente y servido de terapia, siempre de forma placentera y narcótica.

Índice

Introducción	6
La transferencia horizontal de genes (THG)	16
¿Qué es la transferencia horizontal de genes?	16
Clasificación de eventos de THG	17
Mecanismos propuestos de THG	20
Conjugación	20
Transducción	21
Endogenización	22
Transformación	23
Etapas de la THG en eucariontes	25
Fuente exógena de material genético	25
Internalización del material genético externo	27
Integración del ADN foráneo en el genoma	28
Expresión del ADN foráneo	30
Transferencia vertical de genes (TVG) ajenos	32
Detección y evaluación de la THG	34
Métodos físicos para la detección y evaluación de la THG	34
Métodos bioinformáticos para la detección y evaluación de la THG	35
Evidencias y críticas de la THG en eucariontes	38
Ejemplos de THG en Eucariontes	38
THG en protistas	39
THG en hongos	44
THG en plantas	48
THG en animales	56
THG masiva en eucariontes	67
THG de <i>Wolbachia</i> hacia eucariontes	72
THG intercelular en plantas y animales: El ADN circulante	79
THG intraorganísmica	91

Discusión	94
Clasificación ecológica de la THG	94
Detección de eventos de THG en eucariontes	98
THG en eucariontes	99
Consecuencias de la THG en eucariontes	103
Conclusiones	107
Referencias	109

Introducción

Cuando Charles Darwin publicó “El Origen de las Especies” hace ciento cincuenta años, se generó una de las mayores revoluciones no sólo científicas, sino también sociales, que ha vivido la humanidad. En dicho ensayo, Darwin expuso la teoría de la evolución, en donde la herencia vertical de caracteres de los padres a la descendencia a través de distintas generaciones juega un papel fundamental. Mediante la selección natural, las características nuevas que les permiten a los organismos ser más aptos en determinado ambiente, permanecen en las poblaciones y son transmitidas a los descendientes, generando así a lo largo del tiempo, la diversidad de organismos, en un proceso que puede ser representado por un árbol que se va bifurcando. A partir de los bosquejos de Darwin, se generó una concepción metafórica de gran impacto respecto a la evolución y este proceso comenzó a visualizarse con la imagen de “el árbol de la vida”, concebido éste, como una representación única de las relaciones evolutivas entre las especies, representando las relaciones evolutivas entre los linajes como un patrón único siempre bifurcando. Se presenta en forma de jerarquías anidadas (*nested*) que se supone son las consecuencias de la descendencia con modificación y especiación. Se asume que todas las formas de vida, pasadas y presentes, tienen un lugar único en este árbol, y también se anticipa que todos los organismos futuros encuentren su lugar conforme el árbol continúa su crecimiento. Dicho árbol muestra una sola raíz con ramificación dicotómica, representando las relaciones entre todas las formas de vida (Figura 1). Gracias a estas ideas, que ahora nos pueden parecer sencillas y comunes por su gran aceptación, Darwin impactó y transformó no sólo el pensamiento académico sino también el pensamiento social en todo el mundo.

Así fue como se distinguieron los tres dominios de la vida, Bacteria (Eubacteria), Arquea (Arqueobacteria) y Eucaria, en donde basados en la filogenia molecular, se podían categorizar todos los organismos (Figura 2).

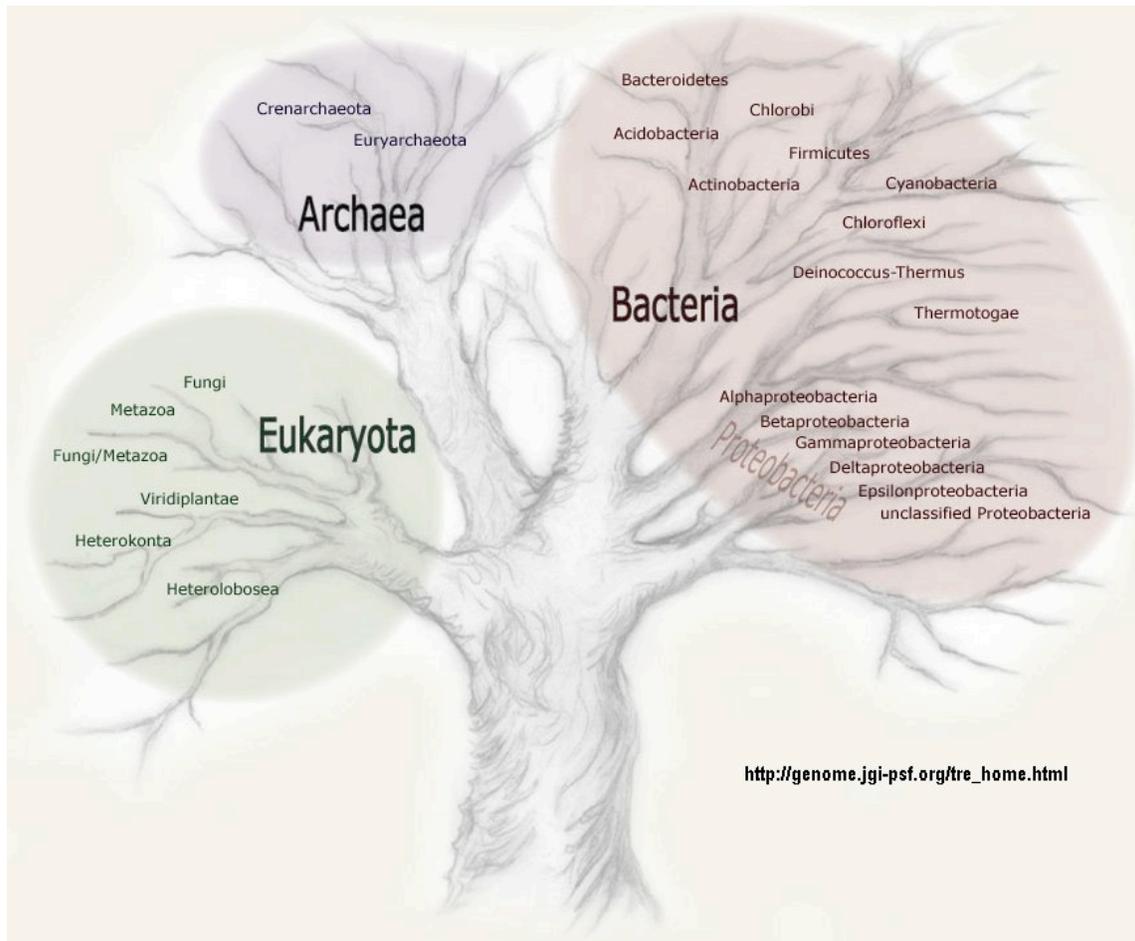


Figura 2. El árbol de la vida describe un proceso constante de la jerarquización evolutiva de todas las formas de vida del planeta, asemejándose a un árbol que se va bifurcando a lo largo del tiempo y en el que los organismos actuales se encuentran localizados en las puntas de las ramas, mientras que las formas más antiguas de vida están localizadas en la base del árbol. "Tree of life", Leila Hornick, 2005 (<http://genome.jgi-psf.org/>)

En varios aspectos, las arqueas están más cercanamente relacionadas a los eucariontes que a las bacterias, por lo que si en efecto las arqueas son el grupo

hermano de los eucariontes, entonces la divergencia de las bacterias sería la más antigua de los tres dominios.

Esta visualización divergente del árbol de la vida supone que las modificaciones genéticas son transmitidas mediante herencia vertical, es decir, que la única manera en que los genes son propagados es cuando los pasamos hacia nuestros descendientes.

Sin embargo, un nuevo cuestionamiento surgió a finales del siglo XX, al comparar las familias de genes recientemente secuenciadas tanto de bacterias como de arqueas y observar que algunas bacterias poseían enzimas de tipo arquea mientras que algunas arqueas contenían las versiones bacterianas. Con el análisis sucesivo de genes microbianos y genomas completos secuenciados, se comenzó a observar que los genomas de estos linajes se encuentran mucho más entremezclados de lo que previamente se llegó a pensar, dando respuesta a distintos cuestionamientos generados por este fenómeno.

De hecho, desde hace tiempo, se reconoce al intercambio de genes (THG) entre procariontes como un proceso biológico muy importante, al grado de que se ha propuesto que una metáfora más adecuada para describir el proceso evolutivo, al menos procarionte, debería ser la de “la red de la vida” (Figura 3), en donde las líneas de la descendencia no sólo divergen sino también se comunican e incluso se fusionan unas con otras, dando como resultado un patrón reticulado². Aunque en efecto la metáfora de “la red de la vida” podría llegar a describir el proceso evolutivo con precisión y claridad, actualmente describe y esquematiza parcialmente lo que en realidad ocurre, pero se enfoca principalmente en los procariontes y, a excepción de algunos eventos de THG ancestrales, relega a la mayoría de los eucariontes (Figura 3).

Al finalizar este ensayo, tendremos un idea modificada de “la red de la vida”, en donde las líneas de descendencia divergen, se comunican y fusionan unas con otras, tanto en procariontes como en eucariontes, involucrando ramas profundas y divergencias recientes.

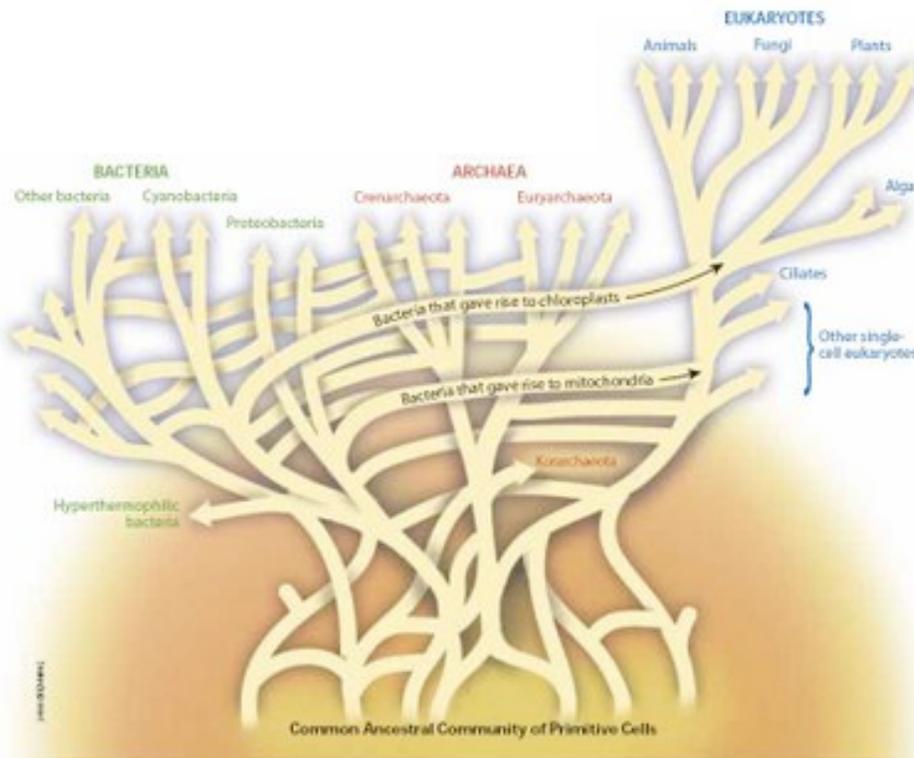


Figura 3. La red de la vida. Las líneas de la descendencia divergen, se comunican y se fusionan unas con otras.

Doolittle, W. F. (2000) Uprooting the tree of life. *Scientific American Magazine*. February: 90-95. (http://people.ibest.uidaho.edu/~bree/courses/2_Doolittle_2000.pdf)

Los primeros efectos evolutivos reconocidos de esta transferencia genética entre distintos organismos fueron, por un lado, la diseminación de genes de resistencia a antibióticos y, por otro, su papel en la facilitación de la recombinación bacteriana³. De acuerdo con Low y Porter (1978)⁴, el término recombinación puede ser utilizado para describir una redistribución de una secuencia a lo largo de moléculas de ácido nucleico.

Entre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, actualmente se reconoce que este intercambio de genes está involucrado principalmente en la evolución de la resistencia a antibióticos, de la patogenicidad y de las vías metabólicas, e incluso, se ha propuesto como responsable de eventos macroevolutivos como la especiación y sub-especiación, sin que exista una aparente distinción ni barreras intergenéricas entre ambos grupos bacterianos⁵ para el intercambio de secuencias genómicas. Además, se ha demostrado que dicho intercambio en los procariontes no sólo involucra transferencias de genes entre bacterias, sino que también involucra la incorporación de genes tanto de arqueas⁶⁻⁸ como de eucariontes⁸⁻¹⁰ por parte de las bacterias. Por todo esto y gracias a los avances de la biología molecular, actualmente se acepta a la transferencia horizontal de genes (THG) o transferencia lateral de genes (TLG), como un motor fundamental de la evolución celular, principalmente de organismos procariontes¹¹⁻¹³.

No hay duda de que la transferencia de genes, operones y grupos de genes juega un papel muy importante en la adaptación de los procariontes a diferentes nichos ecológicos, en la innovación molecular y en el modelado y estructuración de los genomas microbianos¹¹⁻¹³.

¿Pero qué ocurre en el caso de los eucariontes, existe o no existe un mecanismo igual o similar que permita la THG?

Desafortunadamente para el conocimiento y avance científico, por mucho tiempo la TLG involucrando organismos eucariontes ha sido rechazada, criticada y sutilmente considerada como un acontecimiento que ocurre en raras ocasiones. Algunos comienzan a reconocerla en eucariontes microscópicos, pero todavía muy pocos en

plantas y animales. Así lo expresan diversos autores, tanto directa como indirectamente^{3,5,14-32}. Este rechazo ha ocurrido a pesar de que en la actualidad la comunidad científica considera que la constitución general de los organismos eucariontes actuales surgió por THG interespecie tras la integración del genoma, parcial o completo, de organismos endosimbiontes en el genoma de un organismo hospedero, dando origen por ejemplo a la mitocondria, al cloroplasto³³ y al núcleo³⁴⁻³⁶. A pesar, incluso, de la evidencia de la naturaleza quimérica de los genomas eucariontes como resultado de transferencias verticales y horizontales de material genético.

Durante décadas, una parte de la comunidad científica ha tenido la percepción de que la THG no ocurre en eucariontes, ya sea de procariontes hacia eucariontes o de eucariontes hacia eucariontes, asumiéndolo en el mejor de los casos, como un fenómeno excepcional y raro^{15,22}. Este hecho, podría ser el resultado de que la investigación se ha enfocado prioritariamente a los procariontes más que a eucariontes debido: (1) a una mayor cantidad de secuencias disponibles de distintos linajes procariontes que de organismos eucariontes, (2) al reconocimiento de la importancia de la THG en la evolución bacteriana y el debate acerca de qué tan significativa ha sido ésta, (3) a que se ha supuesto que este proceso de transferencia de material genético no es de gran importancia en eucariontes, (4) a que la mayoría de la evidencia de THG en eucariontes proviene de protistas, mientras que la mayoría de biólogos dedicados al estudio de eucariontes, se enfocan a hongos, plantas y animales –pasando por alto tales evidencias de THG en eucariontes y confinándolas a ser vistas como

descubrimientos aberrantes insignificantes– (5) a la costumbre general de descartar en automático las secuencias bacterianas de las muestras –aludiéndolas a errores de contaminación–, y finalmente, (6) al reporte aparentemente erróneo o exagerado referente a la sustancial THG bacterianos hacia el genoma humano. Esta situación empañó eventos más creíbles de la ocurrencia de este fenómeno en eucariontes y, seguramente, ocasionó la inhibición de muchos científicos para continuar la búsqueda de eventos de THG en secuencias recientes de genomas animales por temor a la crítica académica^{15,22}.

Además, otro factor que puede estar influyendo en tal percepción es que los procariontes dependen de la transferencia de genes para facilitar la recombinación de material genético, mientras que los eucariontes desarrollaron la reproducción sexual³.

En cualquier caso, los científicos no debemos dar por hecho las percepciones respecto a los fenómenos; por el contrario, debemos tratar de dar respuesta a las preguntas generadas durante el estudio de algún tema que nos inquiete y cuyas respuestas desconocemos.

Este ensayo surge al cuestionar la posibilidad de la THG en eucariontes, con la finalidad de investigar si la THG sólo ocurre en raras ocasiones, o por el contrario, representa un fenómeno natural y global que comúnmente también afecta a los eucariontes. Si en efecto la THG ocurre en estos organismos de manera espontánea, discutir las posibles consecuencias de la THG en la evolución genómica eucarionte.

Para profundizar más en el tema, de acuerdo con Darwin la selección natural permite a los organismos con mayor adecuación, transmitir de manera vertical a sus descendientes las características adaptativas, lo que a través de varias generaciones

forma parte del proceso evolutivo. Estos postulados son la base para teorizar el origen de los eucariontes a partir de al menos una célula ancestral procarionte. Las características primordiales de este procarionte ancestral que dio origen a los eucariontes fueron tanto su capacidad para mantener a otros organismos (procariontes) a manera de endosimbiontes, así como su capacidad para recibir e integrar genes transferidos horizontalmente. Sin embargo, de acuerdo a lo encontrado en la literatura, pareciera que dichas características se hubieran perdido una vez originados los eucariontes y que la THG no afectara a estos organismos. Pero si acordamos que entre los procariontes vivos y extintos, la THG es un fenómeno común que además de desventajas puede conferir nuevas características y ventajas adaptativas; y siendo que los eucariontes divergieron de los procariontes, ¿será posible que los eucariontes hayan conservado mecanismos de THG que faciliten la adquisición de características ajenas probadas anteriormente por otro organismo y que podrían conferirle ventajas adaptativas al eucarionte receptor? No existe evidencia contundente de la evolución de mecanismos moleculares que impidan la THG en procariontes ni en eucariontes, por lo que queda por responder si la THG, fenómeno común y fundamental entre procariontes, pudo haberse perdido en eucariontes.

Independientemente de los organismos involucrados, actualmente consideramos el origen de los eucariontes como resultado de la endosimbiosis entre procariontes, en donde una característica notable, por no decir esencial de la célula ancestral eucarionte, fue su capacidad para la THG, lo que le permitió integrar en su genoma el material genético de otro u otros organismos, probablemente confiriéndole ventajas adaptativas.

Los cuestionamientos y postulados mencionados anteriormente me motivan a investigar y dilucidar, si el mecanismo para la THG se ha conservado en los eucariontes, resultando en la capacidad actual de los mismos para aprovechar las ventajas de este proceso –ya que las THG que observamos actualmente son las que han conferido ventajas, o bien, han permanecido neutrales, mientras que las desventajas de la THG son más difíciles de observar al no permanecer en la población– , así como las posibles consecuencias evolutivas de ello.

Para poder discutir las consecuencias de la THG en la evolución genómica eucarionte primero necesitamos clarificar si existe o no la THG en eucariontes. Es por ello que en este ensayo se dedica gran parte a la demostración, mediante evidencias directas e indirectas, de la existencia de mecanismos de THG activos en los eucariontes; enfatizando que la transferencia horizontal de material genético es un proceso evolutivo actual en estos organismos, tan importante como lo es en el caso de los procariontes.

En paralelo a la demostración de la existencia de la THG hacia eucariontes, también se mencionan las consecuencias de la THG en la evolución genómica eucarionte que este fenómeno implica, por ejemplo (entre otras cosas y al igual que en los procariontes), la adquisición de funciones novedosas, readquisición de genes perdidos e incorporación de ventajas adaptativas.

En este ensayo se resalta que la THG involucra a todos los eucariontes, no sólo a eucariontes unicelulares principalmente fagocíticos, sino a todos los eucariontes: protistas, plantas, hongos y animales, incluyendo al hombre.

Finalmente, se plantea una economía global del material genético entre todos los organismos actuales: virus, procariontes y eucariontes; desvaneciendo la noción de barreras entre las especies, gracias a la continua circulación horizontal y aprovechamiento del material genético disponible.

La transferencia horizontal de genes

¿Qué es la transferencia horizontal de genes?

Aunque para distintos autores la transferencia horizontal, o lateral, de genes es el proceso de intercambio de material genético entre especies distantemente relacionadas¹⁵, en términos generales, la mayoría de las definiciones se refieren a la THG como al movimiento de información genética ignorando las barreras normales de apareamiento entre organismos relacionados, más o menos distantemente.

La definición de Bordenstein¹⁷, según la cual “la transferencia lateral u horizontal de genes se refiere a la transferencia de material genético de un individuo a otro sin (que intervenga) herencia vertical de los padres a su descendencia”, es una definición más afín a las pretensiones de este ensayo.

Sin embargo, todas las definiciones que hemos encontrado mencionan sólo algunos niveles de jerarquización para distinguir los tipos de THG. La categorización se realiza generalmente con respecto al donador y al receptor del material genético. Usualmente se refieren a cuatro tipos de THG, mencionándolas por separado: (1) la transferencia de material genético entre individuos de la misma especie o de especies distintas, ya sea relacionados cercana o distantemente, (2) transferencia de genes entre dominios, involucrando organismos de dominios distintos, (3) la transferencia de genes de los organelos al núcleo y (4) transferencia horizontal endosimbionte, de un endosimbionte intracelular al genoma de la célula hospedera.

Sin embargo, este tipo de divisiones de la THG aceptan y describen solo algunos procesos “casuales” de THG, suponiendo que se trata de un evento que ocurre rara vez en eucariontes, y entre donadores y receptores específicos, en lugar de reconocer a la THG como un mecanismo global. Esto puede resultar en el reforzamiento de la idea de que la THG hacia eucariontes ocurre como eventos aislados y bajo circunstancias particulares.

Clasificación de eventos de THG

En este ensayo se plantea una clasificación integral de los eventos de THG, reconociendo a la THG como un fenómeno natural global que ha afectado a lo largo del tiempo no sólo a todos los organismos, tanto procariontes como eucariontes, sino también a distintos contenedores de material genético: organelos, células y virus.

Se presentan datos suficientes para incorporar otro nivel de jerarquización para el estudio de la THG que no ha sido mencionado o al menos clarificado previamente, la THG intercelular, es decir, la transferencia horizontal de genes entre las células de un mismo organismo. Como resultado, tenemos al menos, una nueva categoría dentro de las empleadas habitualmente y, aunque más adelante trataremos de incluir todas las posibilidades de THG dentro de una nueva clasificación ecológica de la THG, la clasificación general de eventos de THG quedaría de la siguiente forma:

- 1) THG interespecie, entre individuos de especies distintas.
- 2) THG intraespecie, entre individuos de la misma especie, diferente de la transferencia vertical de genes.
- 3) THG intracelular, que ocurre dentro de una misma célula, ya sea por endosimbiontes intracelulares u organelos, hacia el genoma hospedero.
- 4) THG intercelular o intercambio de material genético entre las células de un mismo organismo.

Cabe resaltar que tanto la THG interespecie como la THG intracelular pueden incluir a organismos endosimbiontes como los donadores del material genético y que la THG interespecie puede incluir a organismos de dominios distintos.

La THG intraespecie contempla los casos de transferencias entre procariontes o eucariontes de la misma especie, sin involucrar a la reproducción sexual; por ejemplo mediante conjugación, transducción o transformación (ver adelante).

En esta clasificación, la THG intercelular considera el intercambio de material genético entre las células de un mismo organismo, lo que (1) no necesariamente significa mismo material genético –ya que por ejemplo éste puede estar mutado o modificado epigenéticamente–, y (2) sin que necesariamente sean organismos endosimbiontes (intra- o extra-celulares) –por ejemplo, cuando se trata de material genético de células ingeridas al alimentarse de un organismo³⁷– (ver adelante).

La THG interespecie, al aceptar el intercambio genético entre organismos de especies distintas, deja de manifiesto la posibilidad de que dichas transferencias sean de dos tipos: (1) THG intradominio, ocurrida entre especies pertenecientes al mismo dominio y (2) THG interdominio, involucrando a organismos de distintos dominios.

Por otro lado, en cuanto a la naturaleza del material transferido, los eventos de THG pueden ser clasificados dentro de tres categorías^{8,20,38}: (a) adquisición de genomas; (b) adquisición de genes –nuevos o readquiridos, parálogos (de genes existentes), xenólogos (de otras especies) y ortólogos (reemplazo de genes existentes pero de otro linaje)–; y (c) adquisición de secuencias no codificantes –genes incompletos o dañados, elementos móviles, entre otros.

Con el objetivo de demostrar que la THG es un proceso que ocurre comúnmente, no sólo en procariontes sino también en los eucariontes, en este ensayo se define a la THG como el traslado de material genético desde una entidad donadora hacia una receptora, independientemente de la categoría en que se clasifique, ya sea intraespecie, interespecie, intracelular e intercelular, y que ocurre independientemente de la transmisión vertical de información genética entre los padres y sus descendientes, e independientemente del tipo celular, ya sea somático o germinal.

Mecanismos propuestos de THG

Junto con la conjugación y la transducción, la transformación también es una fuente importante de THG entre las bacterias. Cabe resaltar que estos mecanismos de transferencia horizontal de genes no son exclusivos de los procariontes, sino que es posible encontrar homología de estos tres tipos de THG bacteriana en eucariontes, algunas veces incluso, interrelacionándose mutuamente.

Conjugación

La conjugación bacteriana es un tipo de THG mediante plásmidos, que requiere contacto directo entre las células bacterianas y estructuras superficiales especializadas para realizar la conexión y transferencia del material genético. La conjugación no es una forma de THG exclusiva entre bacterias, actualmente se reconoce la conjugación entre dominios. Por ejemplo, la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* utiliza la conjugación para transferir material genético hacia eucariontes, particularmente plantas, ocasionándoles agallas del tronco o de la corona (*crown gall tumors*), una enfermedad neoplásica de muchas plantas dicotiledóneas iniciada durante la infección de *A. tumefaciens*, cuando estas bacterias albergan plásmidos de inducción tumoral. Una vez efectuada la transformación, días después de la infección, la presencia de bacterias vivas no es necesaria para mantener el estado tumoral. Distintos autores han reportado la transferencia de material genético de esta bacteria hacia tejidos de distintas plantas al transplantar la línea celular tanto *in vitro* como *in vivo*, así como la transferencia de la información y la expresión en sus descendientes³⁹⁻⁴⁵. Interesantemente, se ha observado que bajo condiciones de laboratorio, el rango de

hospederos de *A. tumefaciens* puede ampliarse a levaduras, otros hongos y células humanas en cultivo⁴⁶. Actualmente se conocen distintas moléculas microbianas y hospederas que participan en el transporte célula–célula y la internalización nuclear de ácidos nucleicos durante la infección por virus de plantas y por *Agrobacterium spp.*⁴⁷⁻⁵¹.

Transducción

La transducción bacteriana es otro mecanismo para la THG intercelular mediada por bacteriófagos. En este mecanismo, el virus (bacteriófago) adquiere una parte del genoma del hospedero bacteriano y lo incorpora a su genoma viral. Cuando el virus se multiplica, muchas copias del virus son liberadas al lisis de la célula infectada o por gemación –en el caso de algunos retrovirus–, llevándose consigo copias de fragmentos genéticos bacterianos. Cuando alguno de estos nuevos virus infecta otra célula, el virus inserta el ADN adquirido previamente de otro hospedero y éste se integra al genoma de la nueva célula hospedera.

En cuanto a la transducción virus-eucariontes, recientemente se reportó evidencia filogenética indicando la transferencia horizontal de siete genes implicados en una vía metabólica (biosíntesis de esfingolípidos), entre la microalga eucarionte cosmopolita *Emiliana huxleyi* y su virus de ADN EhV, siendo el primer caso claro de la THG de múltiples enzimas funcionalmente relacionadas en un sistema fitoplancton (eucarionte)–virus⁵².

Además, en peces como salmones y truchas^{53,54} también se conoce la THG mediada por virus, por ejemplo, los genes de protamina de la trucha se encuentran flanqueados por cajas TATA adicionales –secuencias cercanamente relacionadas a las secuencias

repetitivas largas de un virus del sarcoma aviar—. Estos genes representan una clase relativamente rara de genes sin intrones en eucariontes, lo que sugiere que el gen pudo derivarse de un gen procesado, introducido al genoma de la trucha por la retrotranscripción de un ARNm maduro. Tomando en cuenta que la distribución de estos genes no es uniforme entre los vertebrados, su presencia se sugiere como resultado de la THG posiblemente debido a la infección por retrovirus que adquirieron dichos genes de diferentes especies⁵³.

Endogenización

La endogenización se refiere a la asimilación de secuencias virales dentro de un genoma hospedero, cuando el ADN viral se integra al genoma hospedero de células reproductivas y posteriormente es transferido verticalmente a la descendencia⁵⁵. Por ejemplo, los genomas de diversos mamíferos contienen ADN derivado de retrovirus y virus de la familia bornaviridae, de hecho, actualmente se sabe que el 8% del genoma humano procede de material genético viral⁵⁵, por lo tanto, la endogenización también debe contemplarse como otro mecanismo de THG.

Los elementos transponibles –elementos genéticos capaces de moverse y replicarse dentro del genoma de una misma célula, prácticamente en todos los organismos⁵⁵–, se clasifican en retrotransposones (*LINES* y *SINES*) o transposones (*Helitrons* y *MITEs*), dependiendo de su modo de transposición. Existe evidencia de que aunque los elementos transponibles pueden aparecer *de novo* por el reacomodo genómico provocado por la mutación o recombinación de secuencias genómicas⁵⁶, también pueden incorporarse en genomas hospederos mediante endogenizaciones virales^{57,58}.

Involucrando elementos transponibles, tanto (a) la presencia⁵⁹ y la actividad de algunos elementos transponibles para parasitar genomas eucariontes⁶⁰; (b) la fusión y surgimiento de nuevos genes^{61,62}; (c) la codificación de genes no mamíferos⁶³; (d) la contribución en la elaboración y estructuración de genomas, al menos en mamíferos y tetrápodos⁶⁴; así como (e) la presencia de promotores retrovirales en genomas humanos^{65,66}; resaltan la importancia de los virus en la THG y su impacto en la evolución genómica eucarionte.

Transformación

Este mecanismo de THG promueve la internalización (activa) al citosol bacteriano del ADN extracelular (desnudo) liberado al ambiente, para posteriormente, integrarlo a su genoma. En cuanto a la transformación bacteriana, está claro que la internalización de ADN ambiental de una cadena, es un mecanismo cercanamente coordinado con la recombinación al genoma bacteriano siendo un proceso espacialmente restringido –ubicándose prioritariamente en los polos celulares–. Las proteínas de competencia que permiten la internalización de ADN extracelular ambiental, se encargan (a) del ensamble del pseudopilus, (b) su unión al ADN, (c) el transporte del ADN y (d) la recombinación del ADN de una cadena, en un ADN homólogo de doble cadena. Particularmente en *Bacillus subtilis*, se conocen 16 proteínas distintas que están involucradas en la internalización de ADN extracelular ambiental durante la transformación⁶⁷.

En el caso de las células eucariontes, existe evidencia directa de la presencia de una maquinaria celular involucrada en la THG que actúa de manera homóloga al mecanismo de transformación bacteriana. Actualmente se conocen: (a) receptores superficiales de ADN⁶⁸⁻⁸²; (b) sensores citoplásmicos de ADN⁸³⁻⁸⁵; (c) receptores –tipo Toll (TLR)– que han evolucionado para reconocer ácidos nucleicos (virales⁸⁶⁻⁸⁸, microbianos⁸⁹⁻⁹² y auto-derivados^{89,93-95}), así como para promover la estimulación de respuestas inmunes o la producción de auto-anticuerpos^{96,97}. Se ha reportado (d) la internalización espontánea de ADN de doble cadena –involucrando un mecanismo dependiente tanto de la secuencia como del tipo celular⁹⁸– y (e) la internalización de ADN exógeno por macrófagos⁹⁹. Existen tanto (f) moléculas que promueven la inserción de ADN exógeno para su integración en el genoma hospedero^{100,101}; así como (g) un mecanismo de defensa eucarionte basado en ARN de interferencia contra virus, transposones y retroelementos endógenos y exógenos^{102,103}.

Además de esta maquinaria de internalización e integración de ADN exógeno, existe una maquinaria de expulsión de ADN y ARN, que al integrarlas, conformarían la maquinaria eucarionte de THG. Por ejemplo, en diferentes organismos se ha observado: (a) la expulsión del ADN recientemente sintetizado¹⁰⁴; (b) el empaquetamiento diferencial del ADN y el ARN en cuerpos apoptóticos distintos (durante la muerte celular)¹⁰⁵; (c) la expulsión de macromoléculas asociadas de ARN y lípidos^{106,107}; (d) la liberación celular y tisular de complejos nucleoproteicos con ARN¹⁰⁸ y (e) la presencia de ARNm en distintos fluidos corporales¹⁰⁹. Por otro lado, (f) las células utilizan el ADN liberado para la síntesis de ADN *de novo* (en algunos casos)¹¹⁰.

Además, se conocen (g) partículas citoplásmicas llamada I-somas que contienen ADN informativo (ADN-I) –para ser transcrito y traducido en el citoplasma, y ser transportado entre compartimientos celulares¹¹¹⁻¹¹³. Y también (h) la internalización celular y procesamiento del ARN circulante extracelular –procesado para su captura y tráfico intracelular, influyendo en su estabilización y funcionalidad¹¹⁴.

Etapas de la transferencia horizontal de genes en eucariontes

Existen varios pasos cruciales para que la THG se lleve a cabo de manera que la información sea transmitida a las siguientes generaciones y sea trascendente en la evolución.

Fuente exógena de material genético

Se han planteado varias fuentes externas de material genético mediante las cuales la futura célula eucarionte hospedera podría adquirir genes de manera horizontal. Por ejemplo, en la teoría del origen endosimbionte de los organelos, la célula hospedera se hace de un endosimbionte; eventualmente, éste se convierte en un organelo celular transfiriendo, si no todo, parte de su genoma al genoma de la célula hospedera, siendo en algunos casos funcional³³.

Otro mecanismo de liberación o redistribución de material genético fue propuesto por Doolittle³⁷, principalmente para eucariontes unicelulares con un estilo de vida fagotrófico. La observación de la presencia de genes bacterianos en linajes protistas resultó en la hipótesis “Tú eres lo que comes”, donde Doolittle propone un mecanismo mediante el cual los genes procariontes provenientes del alimento o de bacterias endosimbiontes podrían reemplazar genes eucariontes ancestrales en el transcurso del tiempo evolutivo.

La destrucción de células y organismos infecciosos dentro de un organismo, es otra fuente de material genético exógeno; por ejemplo, las cepas invasivas de *Escherichia coli* que sufren lisis al entrar en células de mamíferos liberan, entre otras cosas, material genético directamente en la célula hospedera¹¹⁵.

Se sabe que al interior de los organismos, distintos tipos celulares liberan ADN, ya sea tratándose de células muertas o en proceso de muerte¹¹⁶⁻¹¹⁸, así como de células y tejidos vivos en forma activa y espontánea^{104,119-129}, particularmente expulsando el ADN recientemente sintetizado^{130,131}, de acuerdo con un mecanismo homeostático¹³¹. Además, se conoce que los fragmentos de ADN extracelular liberados al medio, pueden persistir por mucho tiempo en distintos ambientes¹³²⁻¹³⁵, así como en el interior de distintos organismos^{136,137}, lo que facilita su disponibilidad para la internalización e integración al genoma en alguna célula hospedera, algunas veces, expresándose en proteínas funcionales.

En plantas, se ha planteado que tanto la polinización ilegítima como los vectores compartidos son un factor potencial responsable de la THG entre angiospermas¹³⁸; así como también las interacciones parasitarias entre ellas¹³⁹, sirviendo así como fuente exógena de material genético ajeno. Además, se han sugerido otros vectores para este intercambio de información involucrando plantas: virus, bacteria, hongos, insectos, polen, e incluso meteoritos e injertos^{16,26}.

Internalización del material genético externo en el hospedero

Como se mencionó anteriormente, se reconoce que esta etapa puede requerir o no del contacto físico entre dos organismos¹⁴⁰, por ejemplo en la conjugación (con contacto físico) o en la transformación (sin contacto físico). En cuanto a la internalización de material genético en eucariontes, sin necesidad de contacto físico entre organismos, tanto el ARN extracelular¹¹⁴ como el ADN extracelular, pueden ingresar a las células ya

sea como ADN desnudo¹⁴¹, complejos de ADN-proteína¹⁴²⁻¹⁴⁵, complejos ADN-ARN^{131,146}, complejos de ADN tumoral –los cuales tienen una mayor rapidez y eficiencia de internalización que los complejos de ADN normal¹⁴⁷– o junto con la célula que contiene el gen. Respecto al mecanismo celular eucarionte de internalización de material genético externo, actualmente se conocen: (a) **receptores** que median el transporte de ADN extracelular hacia las células eucariontes^{70-72,75,76,148,149} –en particular, el mecanismo de internalización del ADN de doble cadena está relacionado con polianiones (macromoléculas cargadas negativamente), de manera distinta a la internalización de ADN de una cadena, que es mediado por receptores membranales⁹⁸–; (b) mediante la **fagocitosis** de cuerpos apoptóticos¹⁵⁰, se sabe que el ADN puede transferirse entre las células de un organismo –THG intercelular– y que los macrófagos pueden ingerir ADN bacteriano⁹⁹; también (c) se ha reportado la internalización espontánea y expresión de ADN exógeno por el mecanismo de **endocitosis**^{77,148,149,151} y particularmente en mamíferos (d) la internalización de ADN desnudo por la vía de la **macropinocitosis**^{152,153} dependiente de proteoglicanos, en donde gran parte del ADN internalizado es translocado al núcleo para su expresión¹⁵³, aparentemente, involucrando a las proteínas de enlace citoesqueleto-membrana^{98,152}. En plantas (e) se conocen dos mecanismos por medio de los cuales las moléculas de ácidos nucleicos son transportadas a través de las membranas celulares por medio de **canales membranales**⁴⁸.

Integración del ADN foráneo en el genoma hospedero

Tratándose de secuencias codificantes, una vez dentro de la célula hospedera, el gen puede ser incorporado al núcleo e integrado al genoma celular de forma que pueda ser expresado; dicho material genético puede establecerse a través de la recombinación o transposición en el genoma hospedero¹⁴⁰. De lo contrario, algunas incorporaciones de ADN se convertirán en pseudogenes, ya que los genes que no se encuentren bajo selección purificadora, acumularán mutaciones a una tasa neutral.

El ADN exógeno es usualmente integrado al genoma mediante dos mecanismos: (a) integración dependiente de la homología (*homology-dependent integration/homology-directed modifications*) y (b) la inserción (integración) ilegítima o no homóloga de ADN exógeno al genoma^{154,155}. Existe una relación casi lineal entre la eficiencia de la recombinación y la identidad de la secuencia que flanquea cualquiera de los lados del sitio de inserción¹⁵⁶.

A pesar de que el mecanismo molecular por medio del cual el ADN exógeno se integra al genoma es poco conocido, se ha planteado que (a) la enzima nuclear adenosina fosforribosil transferasa –dependiente de la presencia de rompimientos del ADN para su actividad y necesaria para la ligación eficiente de estos rompimientos en células eucariontes–, es requerida para la concatenación (ligadura extremo-extremo) y la posterior integración del ADN foráneo en el genoma hospedero, así como para la expresión persistente de los genes donados (por ejemplo, llevados por plásmidos que carecen de sus propios orígenes de replicación autónoma) en células proliferantes¹⁰⁰; y que en células humanas, (b) la proteína Metnasa –proteína de reparación de las uniones finales no homólogas (*nonhomologous end-joininig repair protein*)– que regula

la integración genómica de ADN exógeno –estableciendo una relación entre la modificación de histonas, reparación del ADN y la integración al genoma de ADN exógeno, generando la apertura de la cromatina y facilitando la unión de los extremos de ADN¹⁰¹–, promueve la integración de ADN exógeno en el genoma de la célula hospedera.

Por otro lado, se sabe que en células humanas los fragmentos de ADN extracelular alcanzan el espacio nuclear en minutos, en donde son procesados de tal forma que su tamaño linear incrementa de 500pb por fragmento a 10,000pb, probablemente por la activación de las maquinarias celulares de reparación y recombinación del ADN, para la posterior integración del material genético exógeno en el genoma hospedero¹⁴¹. La cantidad de fragmentos de ADN extracelular libre presentes simultáneamente en el espacio nuclear puede alcanzar hasta el 2% del genoma haploide¹⁴¹.

También se ha observado que el ADN foráneo generalmente se localiza cerca de los telómeros, por lo que se especula que la telomerasa puede estar participando en su integración al genoma hospedero, al añadir secuencias teloméricas al ADN foráneo y por lo tanto, proveyendo de un sitio para la recombinación homóloga con un telómero cromosómico¹⁵⁷.

Expresión del ADN foráneo

Al integrarse al genoma hospedero, el gen exógeno debe lidiar con mecanismos de seguridad celular, para poderse expresar en una proteína funcional. Hasta el momento, no está claro el mecanismo mediante el cual los genes transferidos horizontalmente adquieren promotores o cómo es que se pueden seguir expresando. Sin embargo,

utilizando genes reporteros, se ha observado que el ADN puede entrar directamente en plantas, circular dentro de ellas, entrar al núcleo, integrarse a su genoma y expresarse^{158,159}.

En otros estudios de THG de bacterias a plantas, se ha demostrado la internalización de ADN bacteriano, así como su replicación^{40,42} y expresión en la célula hospedera^{42,160}; aunque en algunos casos se observó que para que la transcripción del ADN bacteriano liberado en las células de la planta se lleve a cabo, éste tiene que estar acoplado con su propia RNA polimerasa bacteriana dependiente de ADN –esta polimerasa puede entrar a la célula de la planta con el ADN bacteriano o puede ser sintetizada posteriormente¹⁶¹.

En experimentos *in vivo* e *in vitro* con células y tejidos animales, se ha demostrado que tras su exposición a bacterias, las células y tejidos animales pueden sintetizar ARN bacteriano¹⁶²⁻¹⁶⁶.

Además, se sabe que el ARN extracelular que circula en distintos fluidos de mamíferos, es internalizado por las células y distribuido a distintos compartimentos celulares, en donde puede estar involucrado en la inducción y regulación de procesos celulares como molécula guía o de señalización¹¹⁴.

Aparentemente, existe todo un proceso mediante el cual el ADN extracelular internalizado e integrado al genoma hospedero sufre un proceso de modificación con el objetivo de facilitar su expresión. Se ha demostrado que el ADN bacteriano transferido a células eucariontes puede contener una secuencia poli(A) en el extremo 3' –como se esperaría de una secuencia de cDNA derivado de un ARNm eucarionte–. Aparentemente, la secuencia genómica de los genes bacterianos transferidos, también

puede contener intrones en la región de codificación de la proteína. Tanto la presencia de intrones de empalme como la cola de poli(A) en el ARNm, confirman que dichos genes se encontrarían localizados y expresados en el genoma nuclear; interesantemente, también existen modificaciones en la tercera posición de los codones¹⁶⁷, lo que refleja que la maquinaria celular del eucarionte hospedero realiza modificaciones a los genes bacterianos transferidos tanto para la regulación de la transcripción del gen –*enhancers*, promotores alternativos e incremento de la expresión mediado por intrones–, para la traducción de diferentes proteínas –mediante *splicing* a partir de un mismo gen–, así como modificaciones que acoplan el gen transferido al uso preferencial de codones del genoma hospedero. Otras estrategias para la expresión de genes foráneos son la duplicación de los genes, su re-arreglo en cromosomas y el ajuste a la composición de bases del uso de codones del genoma hospedero¹⁶⁸. Es indudable que todas estas modificaciones han sido integradas al material genómico externo habilitando la expresión de genes bacterianos transferidos horizontalmente hacia eucariontes.

En el caso particular de las plantas, se ha observado que existen diversos mecanismos mediante los cuales los genes transferidos, particularmente de la mitocondria al núcleo, son activados, incluyendo el parasitismo de genes nucleares preexistentes –que codifican proteínas mitocondriales o citoplásmicas– y la activación sin la ganancia de una secuencia blanco mitocondrial (*mitochondrial targeting sequence*)¹⁶⁹.

Transferencia vertical de genes (TVG) ajenos

En principio, se suponen dos opciones para que el material genético ajeno pueda fijarse en una determinada población: (1) que la proteína provea una función, la cual es seleccionada en la población y transferida verticalmente a los descendientes; o bien, (2) pueden presentarse modificaciones neutrales como resultado de la THG y fijarse por otro proceso evolutivo (deriva génica).

A manera de ejemplo, estudios con la planta *Solanum melongena* han demostrado que las modificaciones adquiridas por THG pueden ser transferidas a su descendencia¹⁷⁰. Así mismo, en protoplastos de tabaco transformados por *A. tumefaciens*, se ha observado tanto la expresión de genes bacterianos, al igual que la segregación de marcadores tumorales y la retención de los mismos en subclonas de los transformantes primarios. Los marcadores tumorales fueron heredados a través de meiosis a las semillas de las plantas transformadas⁴³.

Aparentemente, los mecanismos de control de la transposición, son un reflejo de la capacidad general de los organismos eucariontes para detectar, marcar y retener ADN duplicado a través de estructuras de represión de la cromatina¹⁷¹.

Las THGs pueden detectarse por los efectos que generan (ver adelante) y por eso es más fácil estudiarlas cuando son transmitidas a la descendencia (TVG), es decir, como se mantienen a lo largo del tiempo, tenemos la oportunidad de evaluarlas, al compararlas con las secuencias de organismos evolutivamente cercanos y lejanos; sin embargo, no porque no se transmitan a los descendientes significa que la THG no ocurre.

La separación de las células germinales y somáticas, en los organismos multicelulares, se ha utilizado recurrentemente para explicar y sustentar la rareza de la transferencia de genes a organismos multicelulares.

Sin embargo, aunque esta “barrera” existiera y el material genético fuera transferido horizontalmente sólo hacia células somáticas, de todas formas la THG estaría ocurriendo y se transferiría de manera vertical a los descendientes de la célula somática hospedera.

El problema entonces no sería la falta de ocurrencia de la THG sino la dificultad para detectar y estudiar, por ejemplo, estos casos de THG hacia células somáticas de eucariontes, principalmente debido a dos motivos: (1) la dificultad de evaluar la THG hacia células somáticas en organismos multicelulares –en las que probabilísticamente se daría un mayor número de eventos de THG que hacia células germinales–, y (2) el hecho de que la evidencia de estos eventos de THG, generalmente se perderían con la muerte del organismo o de la célula somática hospedera.

Además, como veremos más adelante, la THG intercelular involucrando a las células somáticas puede ser trascendente en la evolución. Por esta razón, considero que tras la THG, el mantenimiento del ADN foráneo existe, independientemente del tiempo de permanencia y del tipo celular blanco, ya sea somático o germinal.

Detección y evaluación de la transferencia lateral de genes

Las transferencias laterales de genes son eventos evolutivos que pueden ser detectados por sus consecuencias, cuando observamos la presencia de genes similares en organismos distantemente relacionados, en lugar de observarlas en el momento en el que están ocurriendo, lo que limita su detección.

De acuerdo con Sætre (2007)¹⁴⁰, existe una variedad de métodos para detectar o confirmar eventos de THG. Estos pueden dividirse en dos grupos, principalmente: métodos físicos y métodos bioinformáticos¹⁴⁰.

Métodos físicos para la detección y evaluación de la THG

Son dos los **métodos físicos** complementarios que pueden identificar genes que están presentes en algunas especies pero ausentes en otras.

- (1) **La hibridación sustractiva** (*subtractive hybridization*): Mediante este método físico, los fragmentos de una secuencia blanco que no encuentran coincidencia para hibridarse con la muestra de ADN a probar, pueden ser recuperados. La clonación y secuenciación de estos fragmentos, identifica genes que son específicos para el blanco (que usualmente es un genoma no secuenciado). Este método puede dar falsos positivos si el porcentaje de identidad de secuencia del ADN a probar y la secuencia blanco disminuye.
- (2) **La hibridación genómica comparativa** (microarreglos de ADN): Con este método se pueden identificar genes que no se encuentran en el genoma blanco. Si la secuencia blanco y la de prueba son muy divergentes como para hibridarse, pueden generarse falsos negativos.

Algunos ejemplos de estas técnicas son: (a) la hibridación por el método tipo *Southern* (*Southern blot hybridization*) –para la detección de genes específicos mediante la unión de ADN-ADN–, (b) la hibridación puntiforme (*dot blot hybridization*) –método análogo al anterior, pero practicado sobre una siembra en forma de manchas de los fragmentos de ADN a analizar, previamente desnaturalizados– y (c) la hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) –para localizar con precisión los tejidos y células que contienen genes o fragmentos de ADN de secuencia complementaria a las sondas marcadas–. Usualmente, en estos métodos se utilizan tanto la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) –técnica utilizada para generar numerosas copias de un segmento específico de ADN de forma rápida y precisa–, como la *PCR* en tiempo real –para monitorear el progreso de la *PCR* cuantitativa mientras ocurre–. Mientras mayor sea el número de copias del ácido nucleico blanco al inicio, más pronto se observará un incremento significativo en la fluorescencia.

Métodos bioinformáticos para la detección y evaluación de la THG

Por otro lado, existen diversos **métodos bioinformáticos** utilizados para revelar eventos de THG.

(1) **Los métodos filogenéticos:** La reconstrucción filogenética es considerada el principal método para la detección de la THG. Los métodos filogenéticos comparativos, utilizan la información de las relaciones de ancestría común entre los organismos (árboles filogenéticos) para comparar a las especies. Si los árboles filogenéticos para muchos genes o proteínas en varios genomas muestran

relaciones conflictivas entre los taxa, esto puede ser debido a la THG. Los árboles filogenéticos basados en secuencias de ADN son más adecuados para el estudio de organismos (parientes) cercanos; mientras que los árboles basados en proteínas, detectan la THG ancestral. Esto se debe a que las secuencias de ADN cambian más rápido que las secuencias de proteínas. La presencia de relaciones conflictivas entre taxa también puede deberse a otros factores como la pérdida de genes linaje-específica, la convergencia y las tasas de mutación desiguales.

(2) **Los análisis de composición:** Los genomas difieren en el contenido de G+C, uso de codones y otras características de composición. Si la composición de nucleótidos de una secuencia difiere de las secuencias vecinas, puede ser indicativo de que ha ocurrido THG. Tanto un gen como una secuencia no codificante originaria de otra especie puede haber sido incorporado al genoma. Este tipo de métodos de detección evitan algunas dificultades, ya que sólo dependen de la información proporcionada por el genoma y no se basa en comparaciones entre genomas. Sin embargo, una señal falsa puede producirse por un sesgo regional de la base de distribución en el genoma. Además, un evento de THG puede ser difícil de detectar porque la señal se pierde conforme las secuencias de ADN evolucionan, es decir, con el paso del tiempo se fijan mutaciones hasta tener la composición base del nuevo genoma.

(3) **Los patrones de distribución de genes:** Si un gen se encuentra en una especie, y a su vez, éste se encuentra en una especie relacionada distantemente pero no en especies cercanas, esto indica que un evento de THG ha ocurrido. Sin embargo, el orden de los genes en los cromosomas se encuentra poco conservado, incluso

entre especies cercanas. Una explicación que puede ser considerada como alternativa a la THG para interpretar esto es la pérdida frecuente de genes.

- (4) **La Homología:** Un método rápido para la detección de THG es la búsqueda de parientes homólogos significativos (significant homologous relatives) mediante herramientas de búsqueda de base de datos como *BLAST*. Cuando los resultados de este tipo de búsquedas indican que la puntuación más alta en homología es de otro taxón que es considerado como distante, entonces puede haber ocurrido THG. Sin embargo, el tamaño y tipo de la base de datos puede afectar los resultados. Además, las proteínas multidominio pueden dar falsos positivos fácilmente.

Los métodos físicos han sido utilizados exitosamente para caracterizar grupos de patógenos y “microbios ambientales” relacionados cercanamente. Mientras que cada uno de los métodos bioinformáticos, aparentemente, detectan preferentemente ciertos tipos de THG por lo que se requiere de la conjunción de varios métodos para obtener una descripción general de la medida de la THG en un genoma. Se ha propuesto que con las diferencias en la composición de bases se puede detectar THG recientes, mientras que los métodos que se enfocan en los patrones filogenéticos entre dominios o entre fila pueden detectar THG ancestrales.

Evidencias y críticas de la THG en eucariontes

Actualmente, la THG está completamente aceptada para el mundo procarionte, incluso si se trata de la THG de eucariontes hacia bacterias y arqueas. Por ejemplo, se conoce que la evolución de algunas proteínas en procariontes ha involucrado una variedad de THG de eucariontes hacia una gran variedad de procariontes, incluso desplazando al respectivo gen bacteriano original¹⁷².

En cuanto a la THG hacia eucariontes, a pesar de que la comunidad científica en su mayoría, sigue considerando a la transferencia lateral de genes como un evento casual casi inexistente para organismos eucariontes multicelulares^{3,5,14-32}, los resultados de diversos grupos de investigación han marcado el inicio del cambio de paradigma respecto a este proceso de intercambio de material genético, al resaltar la importancia de la transferencia horizontal de genes en organismos eucariontes, al menos y hasta el momento, para los eucariontes no humanos.

Mientras más análisis de genes y genomas completos van surgiendo, se incrementa el número de detecciones de eventos de THG en eucariontes. A continuación, se mencionarán algunos ejemplos de THG en eucariontes pero con mayor detenimiento en aquellos ejemplos que involucran la transferencia masiva de genes hacia eucariontes.

Ejemplos de THG en eucariontes

En esta sección se presentan algunos ejemplos que demuestran que la THG es un mecanismo global que involucra también a los eucariontes, no solo como donadores de material genético para los procariontes, sino también como beneficiarios de la

incorporación de genomas procariontes y/o eucariontes durante los eventos de THG. Además, existen otras listas de eventos de transferencia de genes, por ejemplo, interdominios¹⁵. La extrapolación de estos resultados, demuestra de manera directa que la THG ocurre también en los eucariontes, más comúnmente de lo que se pensaba anteriormente, y no sólo involucrando transferencias horizontales endosimbiontes o a protistas fagotróficos, sino a la totalidad de los eucariontes.

THG en protistas

Los protistas son los organismos que presentan las estructuras biológicas más sencillas entre los eucariontes, y pueden presentar una estructura unicelular (siendo ésta la más común), multicelular o colonial (pero sin llegar a formar tejidos). Se trata de organismos autótrofos en su mayoría, y producen un alto porcentaje del oxígeno de la tierra; sin embargo, es complicado establecer características diagnósticas ya que no conforman un grupo monofilético.

Los protistas al igual que los procariontes, son organismos que presentan THG al menos de THG interdominio y THG intracelular. Gran cantidad de eventos de THG han sido reportados en protistas, particularmente, en protozoarios parásitos causantes de infecciones en humanos; seguramente por la gran cantidad de estudios realizados en estos organismos de importancia médica, social y económica. Por ejemplo, de Koning y colaboradores (2000)¹⁸ y otros grupos de investigación, han encontrado evidencia mediante *BLAST* de la THG interdominio de diversas bacterias hacia *Trichomonas vaginalis*. Además Alsmark y colaboradores (2009)¹⁷³, analizando los genomas completos de *Entamoeba histolytica* y *T. vaginalis*, encontraron 68 y 153 casos

recientes de THG en ambos protistas, respectivamente, e involucrando principalmente genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo¹⁷³. También en *T. vaginalis*, Dolezal y colaboradores (2004)¹⁷⁴ sugieren que la enzima málica citosólica utilizada para el desempeño de funciones respiratorias (producción de piruvato y NADPH), es el resultado de la THG bacterianos¹⁷⁴. Mientras que Coombs y colaboradores (2004)¹⁷⁵, encontraron que aunque *T. vaginalis* tiene un estilo de vida anaerobio, también está expuesto al oxígeno y parte de su sistema antioxidante es el resultado de THG procariontes¹⁷⁵. Por otra parte, Striepen y colaboradores (2004)¹⁷⁶, mencionan que la THG ha contribuido con genes para la vía metabólica de la biosíntesis de nucleótidos en *Cryptosporidium parvum*, compensando la pérdida en su genoma de la vía de síntesis *de novo* de las pirimidinas, esencial para el desarrollo y virulencia de otros organismos pertenecientes a su mismo grupo¹⁷⁶.

Al parecer, también el parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*, ha adquirido algunas de sus secuencias genómicas mediante la THG. Durante la infección natural del eritrocito, *P. falciparum* internaliza a su núcleo el ADN del citoplasma de la célula hospedera, lo que sugiere un mecanismo de THG y que el genoma de este parásito puede estar continuamente expuesto al ADN exógeno del material nuclear residual en los eritrocitos hospederos¹⁷⁷.

Mediante análisis filogenéticos, se ha descubierto que distintos genes fueron transferidos de una bacteria hacia un ancestro común de protistas, hongos, plantas y animales. En cuanto a los genes para la sulfuro deshidrogenasa, la transferencia afectó sólo a un grupo de eucariontes, las diplomonas (protistas anaerobios), mientras que la transferencia del gen para la glutamato sintasa probablemente ocurrió antes en la

evolución, afectando a un mayor número de eucariontes¹⁷⁸. Utilizando este mismo tipo de análisis en los cromalveolados, se han identificado eventos de THG ancestrales y recientes en *Karenia brevis* (alga dinoflagelada de vida libre), involucrando eventos independientes de THG con donadores tanto bacterianos como eucariontes (distintos linajes)¹⁷⁹.

En cuanto a la THG intracelular en protistas, recientemente se ha reportado que otra adquisición endosimbiótica primaria de un organelo fotosintético se encuentra en proceso en la amiba testada *Paulinella chromatophora*. Se observó la reducción y THG de parte del genoma de la cianobacteria endosimbionte así como la expresión de “sus genes” fotosintéticos, en el núcleo de *P. chromatophora*, indicando que dicho gen ha sido transferido del cromatóforo hacia el genoma nuclear de la amiba¹⁶⁷. Además, Whitaker y colaboradores (2009)¹⁸⁰ realizaron un análisis sobre la THG intracelular –endosimbionte– de bacterias hacia eucariontes unicelulares respecto a genes que codifican enzimas metabólicas. El estudio reveló la preferencia para conectar enzimas codificadas por genes adquiridos por THG, en la red metabólica, y se estableció el número de enzimas codificadas por genes adquiridos horizontalmente¹⁸⁰.

En resumen, si se considera que los datos genómicos disponibles representan una fracción minúscula de las poblaciones de bacterias y protistas del planeta y que a pesar de esto, se identificaron múltiples casos de THG codificando las mismas proteínas, se puede concluir que la THG contribuye de manera significativa a los genomas protistas¹⁷⁹.

Como es de esperarse, entre los donantes y receptores de material genético existe una amplia gama de linajes procariontes representados, y muchas veces predominan las transferencias horizontales ocurridas entre los organismos que comparten nichos ecológicos similares. Un ejemplo de esto lo observamos entre los protistas *E. histolytica* y *T. vaginalis* y las bacterias del intestino y la mucosa vaginal, respectivamente¹⁷³. Varias de las características de los procariontes donadores adquiridas por estos protistas, mediante THG interdominio, están asociadas a los hábitos actuales de estos hospederos, sugiriendo que la THG puede representar un factor importante en la evolución del parasitismo.

Particularmente, *P. chromatophora* puede proporcionar datos sobre la transición de un endosimbionte (cianobacteria) hacia un organelo fotosintético¹⁶⁷ así como sobre las modificaciones que sufren las secuencias internalizadas para que el genoma hospedero sea capaz de expresarlas, durante el proceso de integración genética de un endosimbionte en una célula hospedera. Su estudio seguramente aportará información trascendente para clarificar los mecanismos involucrados en la THG hacia eucariontes.

Tabla 1. Eventos de transferencia horizontal de genes hacia protistas

Gen o genoma	Hospedero	Donador	Referencia	Cita
<i>psaE</i> (componente esencial en la vía de transporte de electrones en fotosistema I)	<i>Paulinella chromatophora</i>	Cianobacteria (endosimbionte) <i>Synechococcus</i> y <i>Prochlorococcus</i>	Nakayama & Ishida (2009)	167
Varios genes que codifican enzimas metabólicas	Varios eucariontes unicelulares	Bacterias endosimbiontes	Whitaker et al. (2009)	180
HMG-CoA reductasa clase 2 (vía del mevalonato -síntesis de esteroides incluyendo colesterol)	<i>Giardia</i>	Bacteria	Boucher & Doolittle (2000)	En 33

Hidrogenasa de hierro	<i>Nyctotherus</i>	<i>Desulfovibrio</i> (δ -proteobacteria)	Horner et al. (2000)	En 33
Fumarasa clase II	<i>Trichomonas</i>	Bacteria	Gerbod et al. (2001)	En 33
N-acetilneuraminato liasa	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Pasteurellaceae</i> (γ -proteobacteria)	de Koning et al. (2000)	18
GAPDH	<i>T. vaginalis</i>	<i>Pasteurellaceae</i> (γ -proteobacteria)	de Koning et al. (2000)	18
PFO	<i>T. vaginalis</i>	Distintas fuentes	de Koning et al. (2000)	18
68 genes que codifican para enzimas involucradas en metabolismo	<i>T. vaginalis</i>	Distintas fuentes	Alsmark et al. (2009)	173
153 genes que codifican para enzimas involucradas en metabolismo	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Pasteurellaceae</i> (γ -proteobacteria)	Alsmark et al. (2009)	173
Sulfuro deshidrogenasa	Diplomonas	Bacteria	Andersson & Roger (2002)	178
Glutamato sintasa	Ancestro común de protistas, hongos, plantas y animales	Bacteria	Andersson & Roger (2002)	178
Diversos eventos de THG ancestrales y recientes	<i>Karenia brevis</i> (Cromoalveolados)	Distintos linajes de bacterias y eucariontes	Nosenko & Bhattacharya (2007)	179
Varias secuencias genómicas	<i>Plasmodium falciparum</i>	Eritrocitos hospederos	Deitsch et al. (2001)	177
Biosíntesis de isoprenoides (DXP)	Eucariontes que contienen cloroplastos	Distintas bacterias	Lange et al. (2000)	En 33
Prolina racemasa	<i>Candida parapsilosis</i> y hongos miembros de Pezizomicotina, así como varios protistas	Bacterias	Fitzpatrick et al. (2008)	181

Gen TK (timidina cinasa)				
Gen IMPDH (inosina 5' monofosfato deshidrogenasa)	<i>Cryptosporidium parvum</i>	α - o γ -proteobacteria ϵ -proteobacteria	Striepen et al. (2004)	176
Gen que codifica enzima málica citosólica	<i>T. vaginalis</i>	Bacteria	Dolezal et al. (2004)	174
Tioredoxin reductasa	<i>T. vaginalis</i> y otros eucariontes	Diferentes procariontes	Coombs et al. (2004)	175

THG en hongos

Los hongos son un grupo de eucariontes heterótrofos que no tienen cloroplastos, poseen paredes celulares de quitina y células con especialización funcional. Los hongos pueden ser simbioses, formando líquenes –asociándose con algas– o micorrizas –asociándose con las raíces de una planta–. Se estima que entre el 90 y el 95% de las plantas superiores presentan micorrizas de forma habitual. Además, es posible que un mismo hongo forme la micorriza con más de una planta a la vez, estableciéndose de este modo una conexión entre plantas distintas; esto facilita la existencia de plantas parásitas.

Al igual que los protistas, los hongos presentan THG, principalmente interdominio, involucrando bacterias. Por ejemplo, Garcia-Vallvé y colaboradores (2000)¹⁶⁸, combinando análisis de contenido de G+C, empleo de codones y árboles filogenéticos, han descrito la THG de una bacteria hacia el hongo del rumen *Orpinomyces joyonii* –el gen *celA* (endoglucanasa)– y genes involucrados en la degradación de celulosa y otros polisacáridos¹⁶⁸. También se han reportado eventos recientes de THG interdominio de

bacterias hacia *Candida parapsilosis*, hacia miembros de Pezizomicotina y hacia protistas, incluso involucrando la readquisición de un gen homólogo fúngico de una proteobacteria¹⁸¹.

Mediante un ensayo comparativo de genoma extenso –aprovechando la distancia filogenética (divergencia) y esperando que eventos de transferencia más recientes fueran identificados con mayor claridad–, un grupo de científicos encontró un caso potencial de THG en *Ashbya gossypii* y diez casos (0.2% del genoma) potenciales de THG en *Saccharomyces cerevisiae*¹⁵⁷. Mediante el análisis del genoma de *S. cerevisiae*, Novo y colaboradores (2009)¹⁸² han reportado la THG eucarionte-eucarionte, de *Zygosaccharomyces bailii* hacia *S. cerevisiae*, casi exclusivamente en cepas utilizadas en la fabricación del vino, lo que sugiere que estas adquisiciones ocurrieron en eventos recientes de THG¹⁸².

Implementando un acercamiento distinto para generar hipótesis, sugiriendo que tanto las consideraciones ecológicas como fisiológicas pueden utilizarse para identificar genes bacterianos que pueden ser propensos a la THG –puesto que podrían conferir ventajas adaptativas a eucariontes microbianos que carecen de ellas–, se realizó un ensayo en donde se encontró un grupo particular de hongos terrestres con actividad de β -glucoronidasa. Mediante distintos análisis –consistencia topológica de distintos filogramas, la ausencia de intrones en los cuatro genes *gus* identificados y la similitud en propiedades bioquímicas de las β -glucoronidasas de hongos y *Arthrobacter*–, se demostró la THG de bacterias del suelo gram (+) hacia estos hongos ascomicetos¹⁸³.

En resumen, el compartir nichos facilita la THG, como lo ocurrido en el rumen, entre la bacteria *Fibrobacter succinogenes* y el hongo *Orpinomyces joyonii*¹⁶⁸, particularmente de genes que expresan enzimas que pueden contribuir a la ocupación o adaptación a determinado nicho. Incluso como estrategia de búsqueda de eventos de THG, tanto las consideraciones ecológicas como fisiológicas pueden utilizarse exitosamente en la detección de la THG¹⁸³, puesto que podrían representar ventajas adaptativas adquiridas por los eucariontes microbianos.

Estos resultados resaltan la importancia de compartir un ambiente para los organismos que adquieren material genético por transferencia horizontal.

Por otro lado, es importante resaltar que existe una maquinaria celular que participa en distintas modificaciones del material genético transferido –duplicaciones, re-arreglos en cromosomas y ajustes a la composición de bases del uso de codones del genoma hospedero¹⁶⁸–, probablemente facilitando la expresión del nuevo material genético incorporado.

Tabla 2. Eventos de transferencia horizontal de genes hacia hongos

Gen o genoma	Hospedero	Donador	Referencia	Cita
Glutamato sintasa	Ancestro común de protistas, hongos, plantas y animales	Bacteria	Andersson & Roger (2002)	178
Muchos posibles	Hongos	Distintas bacterias	Rosewich & Kistler (2000)	En 33
Catalasas	<i>Aspergillus</i>	Bacteria Gram (+), proteobacteria	Klotz et al. (1997)	En 33

<i>celA</i> (endoglucanasa)	<i>Orpinomyces joyonii</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Garcia-Vallvé et al. (2000)	168
Glicosil hidrolasa	Quitridios (Chytridiomycota)	Bacterias del rumen	Garcia-Vallvé et al. (2000)	168
Prolina racemasa	<i>Candida parapsilosis</i> y hongos miembros de Pezizomicotina, así como varios protistas	Bacterias	Fitzpatrick et al. (2008)	181
Fenazina F (PhzF)	<i>Candida parapsilosis</i>	Proteobacteria	Fitzpatrick et al. (2008)	181
1 caso de THG	<i>Ashbya gossypii</i>	¿?	Hall et al. (2005)	157
10 casos de THG (0.2% del genoma)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	¿?	Hall et al. (2005)	157
Dihidrorotato deshidrogenasa (DHOD)	<i>S. cerevisiae</i>	Lactobacilales	Hall et al. (2005)	157
Aril y alquil sulfatasa (BDS1)	<i>S. cerevisiae</i>	α-proteobacteria	Hall et al. (2005)	157
β-glucoronidasa	Hongos ascomicetos gus (+)	<i>Arthrobacter</i> , bacteria Gram (+)	Wenzl et al. (2005)	183
Intrón del grupo I del gen mitocondrial <i>cox1</i>	70 eventos de THG entre 640 angiospermas	Primero de hongo a angiosperma y después, entre angiospermas	Sánchez-Puerta et al. (2008)	138
THG intracelular de la mitocondria al núcleo	Núcleo de 277 angiospermas	Mitocondria de angiospermas	Adams et al. (2000)	169

Genes de la vía del shikimato	Plantas verdes, algas rojas y hongos	Cianobacteria endosimbionte y procariontes	Richards et al. (2006)	184
-------------------------------	--------------------------------------	--	------------------------	-----

THG en plantas: glaucofitas, algas rojas y plantas verdes

Las plantas son organismos eucariontes autótrofos, tienen células con paredes de celulosa, poseen cloroplastos que permiten la fotosíntesis y, en general, no poseen capacidad de locomoción –Ginkgo y Cycadales (gimnospermas) presentan gametos ciliados. Este grupo de organismos también presenta THG tanto interdominio, intradominio, interespecie, así como THG intra e intercelular. Por ejemplo, en cuanto a la THG interdominio e interespecie, distintos acercamientos –análisis filogenético, comparación de secuencias y pruebas estadísticas–, indican que al menos el 1.42% del genoma (37 genes) del alga roja *Cyanidioschyzion*, fue adquirido por THG ancestral de fuentes distintas a los organelos, previo a la división entre algas rojas y plantas verdes; donde más del 78% de estos genes –algunos de ellos representan homólogos de función similar– se encuentran relacionados con la biogénesis y funcionalidad de cloroplastos²¹.

También utilizando análisis filogenético restrictivo –eliminando por ejemplo genes que se encuentran tanto en procariontes y arqueas así como en eucariontes, genes parálogos, y partiendo de genes presentes sólo en el genoma de *E. coli*–, Almeida y colaboradores (2008)¹⁸⁵, encontraron la THG interdominio ancestral de tres genes, uno de esos genes fue transferido aparentemente de proteobacterias hacia plantas¹⁸⁵. Además, Archibald y colaboradores (2003)¹⁸⁶ han demostrado que la THG interdominio,

interespecie e intracelular ha jugado un papel muy importante en la evolución del alga *Bigelowiella natans* en donde incluso con medidas conservadoras –ya que su estudio sólo contempló genes dirigidos para funcionar en cloroplastos–, cerca del 21% de las proteínas nucleares dirigidas a cloroplastos han sido adquiridas tanto por la THG intracelular del cloroplasto de una alga endosimbionte, como de la THG interespecie procedentes de una variedad de taxa distinta a algas verdes, así como de la THG interdominio procedente de bacterias. Estos genes transferidos involucran una gran variedad de funciones, tales como la biosíntesis de clorofila, fijación de carbón y estructura del ribosoma. Interesantemente, dos de los genes fueron adquiridos de distintas bacterias, lo que además de ejemplificar la THG interdominio de bacterias hacia eucariontes, resalta la noción de que estos genes inicialmente carecerían de la secuencia líder apropiada para su importación hacia el cloroplasto –requerimiento de los genes nucleares que son dirigidos al cloroplasto sorteando las endomembranas gracias a péptidos de tránsito, así como péptido señales adicionales en el caso de algas secundarias (endosimbiontes secundarios)–^{186,187}. Aunque todavía no tenemos claro cómo es que se funcionalizan los genomas procariontes en genomas eucariontes, este ejemplo demuestra que aunque los genes provengan de bacterias, los eucariontes pueden incorporar y utilizar dichos genes con posteriores modificaciones. En la Figura 4, se muestra un esquema conceptual de un mecanismo de THG que, según lo propuesto por Archibald y colaboradores (2003)¹⁸⁶, podría operar en el alga *Bigelowiella natans*. Las flechas rojas muestran la fagocitosis y la posterior digestión de una bacteria o protista, cuyo ADN foráneo ha sobrevivido la digestión y ha sido incorporado por el núcleo del alga. Las flechas azules indican el flujo de información

genética adquirida por THG. Aunque los genes estudiados en este trabajo se encuentran dirigidos a la función de los cloroplastos, el número significativo de genes transferidos horizontalmente que encontraron sólo puede representar una fracción de genes adquiridos por organismos fagocíticos como el alga *B. natans*¹⁸⁶.

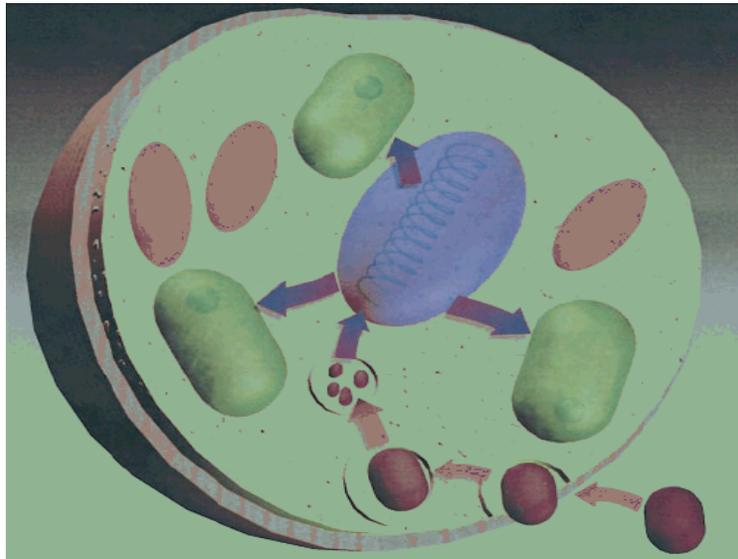


Figura 4. Esquema hipotético de un mecanismo de transferencia horizontal de genes propuesto por Archibald y colaboradores, para el alga *Bigeloviella natans* (obtenido de Raymond y Blankenship, 2003¹⁸⁷).

Respecto a la THG interespecie, tanto Won y Renner (2003)¹⁸⁸ como Ehara y colaboradores (2000)¹⁸⁹, han reportado la transferencia de intrones –particularmente de intrones mitocondriales del grupo II–, los primeros, de angiospermas hacia la planta gimnosperma *Gnetum*¹⁸⁸; mientras que el segundo grupo, de diatomeas hacia algas haptofitas, sugiriendo que estas secuencias usualmente invaden alelos que carecen de intrones a través de las barreras interespecie y en sitios específicos¹⁸⁹.

Siguiendo con la THG interespecie hacia genomas mitocondriales, Davis y Wurdack (2004)¹³⁹ sugieren que al menos parte del genoma mitocondrial de Rafflesiaceae –plantas parásitas endofíticas–, fue adquirido por THG interespecie de la planta

hospedera hacia la planta parásita, demostrando que las relaciones parasitarias pueden facilitar la THG, al menos entre las angiospermas¹³⁹, aparentemente actuando a nivel de un solo gen y no del genoma entero¹⁹⁰.

Por otro lado, Davis (2005)¹⁹¹ ha realizado el primer reporte de la THG interespecie de una angiosperma hacia un helecho, demostrando que *Botrychium virginianum* –helecho micotrófico obligado– ha internalizado genes de plantas parásitas de raíz (Loranthaceae), probablemente a través de parasitismo directo o mediante la mediación de hongos endosimbiontes interconectantes¹⁹¹. Esto se encuentra en concordancia con estudios más recientes de THG interespecie de la planta hospedera hacia la planta parásita, como los de Barkman y colaboradores (2007)³⁸, quienes sugieren la importancia de las plantas parásitas como vectores de THG en angiospermas, e indican que el origen del parasitismo en angiospermas está fuertemente correlacionado con las adquisiciones horizontales del intrón del grupo I del gen *cox1* –sustentado con el surgimiento repetitivo de estilos de vida parasíticos, reportándose al menos once orígenes independientes en la historia evolutiva de las angiospermas, y resultando además, en el incremento del quimerismo genómico de las plantas parásitas a lo largo del tiempo–³⁸. Sánchez-Puerta y colaboradores (2008)¹³⁸ descubrieron que la THG interespecie es muy común en plantas, particularmente, el intrón del grupo I en el gen mitocondrial *cox1* ha sido adquirido frecuentemente en las angiospermas –aproximadamente en 70 eventos de transferencia horizontal entre las 640 angiospermas (de 212 familias) para las cuales el gen *cox1* ha sido caracterizado–. Al parecer, el intrón fue inicialmente transferido a una angiosperma por un hongo y posteriormente ocurrieron las transferencias horizontales entre distintas

angiospermas¹³⁸. Sin embargo, después de realizar una reevaluación de dicho intrón en Araceae y otras angiospermas, Cusimano y colaboradores (2008)¹⁹² sugieren que éste ingresó por THG en un evento único a las angiospermas, se ha transmitido sólo de manera vertical y ha sido perdido en numerosas ocasiones¹⁹².

En cuanto a la THG intracelular, Adams y colaboradores (2000)¹⁶⁹ han demostrado que ésta continúa ocurriendo en las plantas –entre 277 angiospermas analizadas–; representando transferencias de genes funcionales de la mitocondria hacia el núcleo, mediadas por ARN¹⁶⁹. Por otra parte, se ha sugerido que los genes de la vía del shikimato en los Plantae y otros eucariontes fotosintéticos fueron adquiridos mediante una combinación de THG intracelular –transferencia endosimbiótica de genes (cianobacteria-Plantae)– y THG interdominio (procarionte-Plantae). También ha ocurrido la THG de la vía del shikimato tanto en hongos como en algas rojas¹⁸⁴.

En cuanto a la THG intercelular, distintos grupos han demostrado la transferencia de material genético entre las células de una misma planta. Por ejemplo, Stroun M. (1963)¹⁷⁰ reporta que al menos en *Solanum melongena*, distintas modificaciones (características hereditarias) son transmitidas a la descendencia, provocadas por heterógrafos¹⁷⁰; en donde algunas moléculas de ácidos nucleicos con información genética, pueden entrar tanto en células somáticas como reproductivas y permanecer activas¹⁹³. Interesantemente, Gahan P. B. (2003)¹⁵⁹ afirma que las plantas liberan el ADN recientemente sintetizado, el cual puede circular libremente en la planta, de célula en célula, probablemente vía plasmodesmos (canales citoplásmicos que interconectan células adyacentes de las plantas a través de sus paredes celulares), pudiendo entrar

al núcleo, en donde es transcrito y expresado en la célula hospedera, aparentemente actuando como un ADN mensajero¹⁵⁹.

En resumen, para grupos como el de Almeida y colaboradores (2008)¹⁸⁵ en concordancia con reportes anteriores, la mayoría de los casos de THG que pueden identificarse mediante análisis filogenéticos ya se han identificado, además de que según ellos, la ocurrencia de THG ha sido sobreestimada y las hipótesis alternativas se han dejado de lado, mencionando también que las THG interdominio ancestrales no son tan prevalecientes como han sido sugeridas, además de que se encuentran restringidas a ciertos grupos^a (por ejemplo, dicho grupo no detectó evidencia de THG involucrando animales)¹⁸⁵.

Sin embargo, otros grupos científicos reportan que la THG ha provisto a la planta ancestral de nuevas funciones, muchas veces esenciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas –biogénesis y funcionalidad de cloroplastos, biosíntesis de clorofila, fijación de carbón y estructura del ribosoma–, basándose en la evidencia de transferencia horizontal de una gran cantidad de genes hacia algas (por ejemplo, el 1.42% del genoma en *Cyanidioschyzion*²¹, así como el 21% de genes que codifican proteínas dirigidas a cloroplastos en *Bigeloviella natans*¹⁸⁶), así como la transferencia de intrones mitocondriales del grupo II, tanto de diatomeas hacia algas¹⁸⁹ como de angiospermas hacia gimnospermas¹⁸⁸, entre otras evidencias. Aparentemente, las relaciones parasitarias directas pueden facilitar la THG, al menos en angiospermas¹³⁹, al igual que mediante la mediación de hongos endosimbiontes interconectantes¹⁹¹.

^a “The results obtained here were expected in view that IDHGT (...Interdomain HGT...) is for obvious biological reasons more likely to occur between simple, unicellular organisms.”¹⁸⁵

Interesantemente, el origen del parasitismo en angiospermas está fuertemente correlacionado con las adquisiciones horizontales del intrón del grupo I del gen *cox1*³⁸. Entre 277 angiospermas analizadas, se demuestra también la ocurrencia de THG, particularmente intracelular del núcleo a la mitocondria¹⁶⁹. En general y a pesar de las dificultades en la identificación de THG, las múltiples internalizaciones del mismo gen de distintos donadores procariontes, sugieren que la THG en plantas, es un proceso continuo y dinámico²¹, e incluso, común entre las células de una misma planta –THG intercelular–, como lo demuestran diversos estudios^{158,159,170,193}.

Cabe resaltar, que en plantas se ha planteado la THG interespecie no sólo involucrando plantas ancestrales o actuales, sino también de linajes ancestrales hacia linajes más recientes, es decir, esta interpretación implica la existencia del gen transferido, por millones de años, en un intermediario –un agente vector o planta hospedera– no identificado¹⁶ (trad. pers.)^b, a pesar de todo, sin adquirir mutaciones²⁶. Al respecto, Bergthorsson y colaboradores (2003)¹⁶ sugieren que por ejemplo, los meteoritos podrían representar tal agente vector para esos casos particulares de THG¹⁶.

Tabla 3. Eventos de transferencia horizontal de genes hacia plantas

Gen o genoma	Hospedero	Donador	Referencia	Cita
Glutamato sintasa	Ancestro común de protistas, hongos, plantas y animales	Bacteria	Andersson & Roger (2002)	178

^b Bergthorsson et al., 2003: "...imply the existence of the transferred gene in an intermediate, unidentified vectoring agent or host plant for million of years"¹⁶.

Biosíntesis de Isoprenoides (DXP)	Eucariontes que contienen	Diversas bacterias potenciales	Lange et al. (2000)	En 33
37 genes (1.42% del genoma)	<i>Cyanidioschyzon</i> (alga roja)	Varias fuentes distintas a los organelos	Huang & Gogarten (2008)	21
Desoxi xilulosa 5 fosfato sintasa (DXPS)	Plantas	Proteobacteria	Almeida et al. (2008)	185
21% de las proteínas dirigidas a cloroplastos	<i>Bigeloviella natans</i>	Alga endosimbionte y una variedad de taxa distinta a algas verdes, incluyendo bacterias	Archibald et al. (2003)	186
Intrones –particularmente el intrón 2 mitocondrial del grupo II, nad1 y exones adyacentes b y c–	<i>Gnetum</i> (gimnosperma)	Angiospermas	Won & Renner (2003)	188
Intrones mitocondriales del grupo II	Algas haptofitas	Diatomeas	Ehara et al. (2000)	189
Parte del genoma mitocondrial	Rafflesiaceae (angiospermas parásitas endofíticas)	Angiospermas (planta hospedera)	Davis & Wurdack (2004)	139
Varios genes	<i>Botrychium virginianum</i> (helecho)	Loranthaceae (angiospermas parásitas de raíz)	Davis (2005)	191

26 genes (probablemente, cientos de genes mitocondriales)	<i>Amborella trichopoda</i>	Múltiples donadores (principalmente eudicotas y musgos)	Bergthorsson et al. (2003, 2004)	16,194
Intrón del grupo I del gen mitocondrial <i>cox1</i>	70 eventos de THG entre 640 angiospermas	Primero de hongo a angiosperma y después, entre angiospermas	Sánchez-Puerta et al. (2008)	138
THG intracelular de la mitocondria al núcleo	Núcleo de 277 angiospermas	Mitocondria de angiospermas	Adams et al. (2000)	169
Genes de la vía shikimate	Plantas verdes, algas rojas y hongos	Cianobacteria endosimbionte y procariontes	Richards et al. (2006)	184

THG en animales

Los animales agrupan a un conjunto de eucariontes que comúnmente ha sido vetado por distintos autores de participar en el proceso de THG. Sin embargo, distintos experimentos han demostrado que los animales también participan en la THG interdominio, interespecie, intracelular e intercelular.

En cuanto a la THG interdominio hacia animales, el grupo de Ricard y colaboradores (2006)¹⁹⁵ demostró la expresión de genes bacterianos en ciliados que habitan en su cercanía en el rumen del intestino de rumiantes. Se identificaron 148 genes de ciliados que fueron adquiridos de bacterias y/o arqueas por THG después de la colonización del intestino por los ciliados del rumen. Cabe señalar que más del 75% de los genes

transferidos están involucrados en el metabolismo, específicamente, en el catabolismo de carbohidratos complejos¹⁹⁵. También el grupo de Denker y colaboradores (2008) encontró evidencia de adquisición de genes a través de distintos eventos de THG interdominio de procariontes hacia metazoarios, particularmente en el grupo de los cnidarios –anémonas de mar, erizos, medusas, corales, entre otros–, con consecuencias evolutivas para la generación de células urticantes o nematocitos, estructuras que son utilizadas por estos organismos para capturar a sus presas¹⁹, como defensa y locomoción.

Mitreva y colaboradores (2009)²⁷, utilizando un acercamiento genómico, realizaron la identificación de genes candidatos de THG en nemátodos parasíticos de plantas, incluyendo genes no relacionados con la degradación enzimática de la pared celular. Para ello, utilizaron un análisis de alto rendimiento computacional con la finalidad de averiguar si los nemátodos adquirieron la capacidad para producir y secretar celulasas vía THG (como lo plantearon Keen y Roberts, 1998²³) de bacterias del suelo hacia nemátodos bacterívoros ancestrales, lo que les habría permitido cambiar o ampliar su dieta y colonizar un nuevo hábitat, las plantas²⁷.

En el 2001, el Consorcio Internacional para la Secuenciación del Genoma Humano, publicó un reporte sobre la secuencia inicial y análisis del genoma humano, entre otras cosas, mencionando la existencia de cientos de genes humanos que probablemente eran resultado de THG interdominio de bacterias en algún punto del linaje de los vertebrados; mencionaron también, que docenas de genes aparentemente fueron derivados de elementos transponibles. Resultó interesante un grupo de 223 proteínas con similitud significativa a proteínas de bacteria pero sin similitud comparable con

proteínas de *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster* y *A. thaliana* o de hecho, con cualquier otro eucarionte invertebrado. Con un análisis computacional más detallado, al menos 113 de estos genes se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias pero entre los eucariontes sólo están presentes en los vertebrados. Es posible que estos genes se hayan perdido en levadura, nemátodo, mosca de la fruta y *A. thaliana* y, probablemente, en otros linajes eucariontes de invertebrados; aunque como explicación más parsimoniosa, se sugirió la posibilidad de la THG de distintas bacterias al linaje de los vertebrados (o pre-vertebrados)¹⁹⁶.

Al respecto, Salzberg y colaboradores (2001)³⁰ publicaron que la pérdida de genes combinada con los efectos del tamaño de la muestra y la variación de la tasa evolutiva, proveen una explicación alternativa más biológicamente plausible. Este grupo se enfocó en la detección de posibles THG interdominio de bacterias hacia vertebrados, analizando patrones de distribución de genes a través de los taxa. Su estudio difirió en cuanto a que incluyó el proteoma humano reportado por Craig Venter y colaboradores¹⁹⁷, así como el proteoma de linajes parásitos no incluidos en el estudio previo. Al igual que en el estudio realizado por el Consorcio Internacional, las transferencias a vertebrados fueron descartadas por Salzberg y colaboradores³⁰ si un gen homólogo era encontrado en un genoma eucarionte de invertebrado. Su búsqueda se redujo a un grupo de 72 genes y, de los que tuvieron suficiente número de genes relacionados, sus árboles filogenéticos fueron generados, encontrando que la mayoría no mostraba patrones consistentes con transferencia de genes de bacteria a vertebrados. Al combinar más información y descartar más genes, se obtuvo un grupo de entre 40 y 50 genes que comprende candidatos para posibles THG entre bacterias y

humanos. Sin embargo, este grupo sostiene que la explicación más probable para la existencia de genes compartidos por humanos y procariontes, pero ausentes en invertebrados, es una combinación de: (1) la variación en la tasa evolutiva; (2) la muestra tan pequeña de genomas invertebrados –a mayor cantidad de genomas, menor la cantidad de posibles THG de bacteria a humanos–; y (3) la pérdida de genes en linajes invertebrados³⁰.

Además, Stanhope y colaboradores (2001)³¹ han reportado un análisis filogenético de 28 genes propuestos como resultado de THG en el que muestran su presencia en eucariontes derivados más ancestralmente (muchas de esas secuencias disponibles en bases de datos *EST* de eucariontes invertebrados) y que pueden explicarse en términos de descendencia a través de ancestría común, por lo que es poco probable que representen casos de THG interdominio de bacterias hacia vertebrados³¹.

Aunque aún no se clarifica si la presencia de genes bacterianos en el genoma humano (o de vertebrados) se deba a la THG, los datos publicados por el Consorcio Internacional junto con los de Salzberg y colaboradores, demuestran que a pesar de que en sus análisis se excluyeron genes presentes en genomas de invertebrados –como si éstos no pudieran ser sujetos de THG hacia vertebrados o con la intención de facilitar su detección–, ambos estudios arrojaron 113 y entre 40-50 genes, respectivamente, como posibles candidatos de eventos de THG. Es decir, inclusive realizando aproximaciones restrictivas, se pueden encontrar posibles eventos de THG hacia humanos. Por lo tanto, conforme se aumente el número de genomas secuenciados podremos realizar análisis comparativos más certeros y clarificaremos la importancia de la THG de bacterias y otros organismos, hacia humanos (vertebrados).

Con respecto a la THG interespecie, Rumpho y colaboradores (2008)¹⁹⁸ encontraron evidencia de la transferencia de genes entre dos eucariontes, el alga *Vaucheria vitorea* y su depredador, la babosa de mar *Elysia chlorotica*, aparentemente la babosa de mar mantiene con éxito los cloroplastos fotosintéticos del alga de la cual se alimenta, al haber adquirido, y tener la capacidad de expresar, los genes del alga. Cabe resaltar que la transmisión vertical no es un prerrequisito para la THG ya que el alga no se transfiere verticalmente a la descendencia de la babosa de mar, sino que es adquirida a través de la depredación¹⁹⁸, así como ocurre en algunos casos de THG de bacterias, hongos y plantas, hacia rotíferos¹⁹⁹.

En cuanto a la THG involucrando transposones, el grupo de Pace II y colaboradores (2008)⁶⁴ ha reportado la transferencia horizontal interespecie de un conjunto de elementos móviles de ADN, llamados *space invaders* (SPIN *elements*) hacia tetrápodos distantes, incluyendo especies de cinco órdenes distintos de mamíferos, roedores murinos (rata/ratón), gálago (lémur/primate pro-simio), murciélago (laurasiaterios), musaraña (afroterios), zarigüeya (marsupial) y dos tetrápodos no mamíferos (lagartija del género *Anolis* y rana africana de uñas *Xenopus laevis*). Estos hallazgos indican múltiples transmisiones horizontales ocurridas alrededor del mismo tiempo evolutivo (15-46 millones de años) dando lugar a una de las mayores ráfagas de actividad de transposones registradas –cerca de 100,000 copias de elementos SPIN por genoma haploide en el tenrec. Además, este proceso de THG interespecie dio como resultado la generación de un nuevo gen en el linaje murino, derivado de la transposasa del SPIN⁶⁴. A su vez, Leaver (2001)²⁰⁰ presenta evidencia de la transmisión horizontal de una nueva subfamilia de transposones tipo Tc1 en peces (*Pleuronectes platessa* y

Salmo salar) y ranas (*Rana temporaria*), en donde pueden constituir hasta el 1% del genoma total. Aunque casi todos los elementos tipo Tc1 aislados hasta la fecha no son funcionales, este grupo encontró un transposón tipo Tc1 que contiene secuencias repetidas invertidas (*IRS*) conservadas flanqueando un gen de transposasa aparentemente intacto²⁰⁰.

También, se sabe que las secuencias Alu –elementos transponibles muy exitosos–, accedieron a la línea germinal de los primates ancestrales hace aproximadamente 60 millones de años, probablemente por THG, pudiendo participar en la especiación de los primates (revisado en⁵).

Experimentalmente, la THG interespecie se ha observado, por ejemplo en ranas, en donde el ARN bacteriano es sintetizado en las aurículas que han estado en contacto directo con sobrenadantes libres de bacteria (*B. subtilis*)¹⁶³. También se sabe que tras una infección bacteriana, distintos órganos pueden sintetizar el ARN bacteriano¹⁶⁶. Interesantemente, tras la inyección intraperitoneal de distintas bacterias (*B. subtilis*, *E. coli* y *A. tumefaciens*), el cerebro de la rana, a pesar de que de forma natural presenta una barrera protectora contra las bacterias, éste expresa ARN bacteriano, aparentemente como resultado de la transcripción del ADN transferido de la bacteria a las células del cerebro de la rana¹⁶⁵. Cabe resaltar que el ADN bacteriano purificado e inyectado no se transcribe, a pesar de que rápidamente penetra en las células cerebrales sin perder sus estructuras primaria y secundaria. Supuestamente, aunque puede internalizarse en las células y replicarse, el ADN bacteriano liberado espontáneamente y transferido, sólo puede ser transcrito en las células hospederas de

plantas¹⁶¹ y animales¹⁶³ si está acompañado de su propia RNA polimerasa dependiente de ADN^{161,163}.

Involucrando virus, Gilbert y colaboradores (2009) proveen evidencia de la THG interespecie, particularmente los lentivirus han infiltrado repetitivamente las células germinales de siete especies de lémures de los géneros *Cheirogaleus* y *Microcebus*, fijándose y transmitiéndose de manera vertical, en un proceso denominado como endogenización²⁰¹.

En resumen, la adquisición de genes por THG en animales, aparentemente ha facilitado la adaptación a nuevos nichos, como en el caso de los ciliados, que al adquirir genes de catabolismo de carbohidratos complejos, han logrado colonizar el rumen del intestino de rumiantes¹⁹⁵. En animales, encontramos también el primer ejemplo reportado de THG interdominio con un impacto significativo en la evolución de un filum animal entero, debido a que las células urticantes de los cnidarios –la PGA sintasa que es utilizada para la formación de nematocitos– son vitales para estos organismos y constituyen la mayor característica derivada compartida del filum¹⁹. Al parecer, la depredación representa una vía que facilita la THG en eucariontes, como lo demuestran tanto el caso de la THG del alga *Vaucheria vitorea*, hacia su depredador, la babosa de mar *Elysia chlorotica*, y el de los rotíferos, quienes han adquirido genes de bacterias, hongos y plantas¹⁹⁹; y como ha sido sugerido para nemátodos bacterívoros^{23,27}.

Aunque mediante análisis filogenéticos y otros análisis de genomas de vertebrados, se ha mencionado la poca probabilidad de eventos de THG interdominio de bacterias

hacia vertebrados^{30,31}, al menos 113 genes han sido previamente postulados por el Consorcio Internacional para la Secuenciación del Genoma Humano como posibles eventos de THG de bacterias hacia vertebrados¹⁹⁶. Incluso, aumentando las restricciones, entre 40 y 50 genes comprenden candidatos para posibles THG entre bacterias y humanos³⁰; por lo que estos resultados deben reanalizarse hasta obtener explicaciones certeras respecto a su presencia, ya que los argumentos estadísticos de Salzberg y colaboradores (2001)³⁰ no pueden eliminar la posibilidad de que algunos de estos genes candidatos –u otros eliminados en su aproximación– sean casos de THG hacia humanos. Por ejemplo, preparando árboles filogenéticos para siete genes proporcionados por Salzberg y colaboradores³⁰, se ha encontrado un probable evento de THG entre bacterias (*Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis*) y vertebrados (humanos)¹⁴.

Por otro lado, se ha reportado que la THG interespecie en animales involucrando transposones, ha contribuido significativamente en la modelación y diversificación de genomas, incluso, generando nuevos genes, en múltiples especies de tetrápodos (mamíferos y reptiles) y peces, alcanzando a representar hasta el 1% del genoma total^{64,200}. También se ha observado la THG, endogenización, fijación y TVG, de virus que han infiltrado células germinales de lémures²⁰¹.

También se ha observado la THG interespecie de genes bacterianos hacia animales, en donde tras una infección bacteriana, distintos órganos pueden sintetizar ARN bacteriano, incluso un órgano que tiene una barrera protectora contra las bacterias puede ser alcanzado por moléculas informativas ajenas y que, como en el caso de los virus, los ácidos nucleicos bacterianos, algunas veces pueden actuar como agentes infecciosos¹⁶³⁻¹⁶⁶. Estos experimentos resaltan la importancia de la inclusión de la THG

intercelular en el estudio de la evolución de los genomas, sobre todo al contemplar que las barreras tisulares muchas veces no son suficientes para impedir el acceso a genomas externos y, como en el caso del cerebro, el material genético foráneo podría acceder también a las células germinales.

Más adelante profundizaremos en la THG intracelular, principalmente involucrando transferencias de la α -proteobacteria endocelular del género *Wolbachia* hacia distintos insectos, así como la THG intercelular, particularmente involucrando al ADN circulante en humanos.

Tabla 4. Eventos de transferencia horizontal de genes hacia animales

Gen o genoma	Hospedero	Donador	Referencia	Cita
Glutamato sintasa	Ancestro común de protistas, hongos, plantas y animales	Bacteria	Andersson & Roger (2002)	178
148 genes	Ciliados del rumen del intestino de rumiantes	Bacterias y arqueas	Ricard et al. (2006)	195
Sub-unidad bacteriana poli- γ -glutamato (PGA) sintasa	Cnidarios (metazoarios)	Procariontes	Denker et al. (2008)	19
Varios genes incluyendo genes para la producción y secreción de celulasas	Nemátodos parasíticos de plantas	Bacterias del suelo	Mitreva et al. (2009)	27
Varios genes	<i>Elysia chlorotica</i> (babosa de mar)	<i>Vaucheria vitorea</i> (alga)	Rumpho et al. (2008)	198

113 genes (candidatos)	Vertebrados (o pre-vertebrados)	Diversas bacterias	Lander et al. (2001)	196
Muchos posibles (40-50)	Human (vertebrate) genomes	Potencialmente diversas bacterias	Salzberg et al. (2001)	30
N-acetilneuraminato liasa	Human (vertebrate) genomes	<i>Vibrio and Yersinia</i>	Andersson et al. (2001)	14
Transposones (<i>SPIN</i>) (hasta 100,000 copias en el tenrec)	Especies de cinco órdenes distintos de mamíferos, roedores, gálago, murciélago, tenrec, zarigüeya y dos tetrápodos no mamíferos	¿?	Pace II et al. (2008)	64
Transposones tipo Tc1 (hasta 1% del genoma)	<i>Pleuronectes platessa</i> y <i>Salmo salar</i> (peces); <i>Rana temporaria</i> (rana)	¿?	Leaver (2001)	200
Secuencias Alu	Primates ancestrales	¿?	de la Cruz & Davies (2000)	5
Endogenización viral	7 especies de lémures de los géneros <i>Cheirogaleus</i> y <i>Microcebus</i>	Lentivirus	Gilbert et al. (2009)	201

Operón bacteriano Pyr (biosíntesis de pirimidina), 6 ADN polimerasas, 5 helicasas, 3 ADN ligasas, ARN polimerasas	Tripanosoma	Virus y bacterias (bacteriófagos, virus de la fiebre porcina africana (ASF/Caudovirales), fago T4 y fago tipo T3 o T7)	Opperdoes y Michels (2007)	202
Vía metabólica completa para la biosíntesis de novo de piridoxal 5'-fosfato (forma activa de la vitamina B6)	<i>Heterodera glycines</i> (nemátodo fitoparásito)	Bacteria (probablemente <i>Protochlamydia</i> <i>amoebophila</i>)	Craig et al. (2008)	203
THG masiva	Bdelloidea (rotíferos)	Bacterias, hongos y plantas	Gladyshev et al. (2008)	199
30% de los 222 genes de <i>Wolbachia</i> , con variaciones intraespecie de 2.9% de los genes adquiridos	Callosobruchus chinensis (gorgojo del frijol adzuki); particularmente, en el cromosoma X	<i>Wolbachia</i> (α - proteobacteria endocelular)	Kondo et al. (2002), Nikoh et al. (2008)	28,204
Dos genes (altamente expresados)	<i>Acyrtosiphon</i> <i>pisum</i> (áfido)	<i>Wolbachia</i> y una bacteria no descrita	Nikoh & Nakabachi (2009)	205
Fragmentos de genoma	Al menos, 16 especies de insectos	<i>Wolbachia</i>	Fenn et al. (2006); Hotopp et al. (2007), Kondo et al. (2002), Nikoh et al. (2008), Nikoh	20,28,204-208

			& Nakabachi (2009), Klasson et al. (2009), Woolfit et al. (2009)	
Desde pequeñas inserciones de 500pb hasta el genoma entero de más de 1000pb	<i>Drosophila ananassae</i>	<i>Wolbachia</i>	Hotopp et al. (2007)	20

THG masiva en eucariontes

Aunque poco a poco se comienza a dar un giro de 180° en cuanto a la concepción de la THG en eucariontes, por lo general, ésta es rechazada. Algunas veces se aceptan casos aislados de THG, particularmente involucrando protistas. Pero de acuerdo con distintos autores, la percepción común respecto a la THG en eucariontes ha sido el que este mecanismo es nulo o poco trascendente, involucrando esporádicamente a un gen^{3,5,14-32}. Sin embargo, como hemos visto, la THG involucra tanto a los procariontes como a los eucariontes. Y por el contrario, ahora podemos asegurar que la THG en eucariontes es en efecto trascendente. Con la finalidad de clarificar que el proceso de THG en eucariontes es realmente trascendental en su evolución y que no implica exclusivamente eventos raros de transferencia de un solo gen de manera esporádica, a continuación mencionaremos algunos casos de THG masiva hacia organismos eucariontes, particularmente en protistas, plantas y animales (nemátodos); y después nos enfocaremos en la THG masiva hacia insectos, involucrando a la α -proteobacteria *Wolbachia*.

Por ejemplo, en protistas se ha planteado indirectamente la existencia de THG masiva. Opperdoes y Michels (2007)²⁰² han argumentado que la evolución de procesos novedosos específicos de tripanosoma y su organización, sólo serían posibles por la adquisición de un gran número de genes foráneos provenientes de virus y bacterias, incluyendo genes transferidos de una cianobacteria o cloroplasto, como en el caso del operón bacteriano *Pyr* –involucrado en la biosíntesis *de novo* de pirimidina, así como genes del metabolismo de azúcares. Además, la polimerasa γ (gamma) mitocondrial original encontrada en la mitocondria de todos los demás eucariontes se ha perdido de la mitocondria en tripanosomátidos y ha sido reemplazada por otras seis ADN polimerasas filogenéticamente más cercanas a genes correspondientes a bacteriófagos y virus de la fiebre porcina africana (ASF/Caudovirales). En estos organelos de tripanosomas también se encuentran tres ADN ligasas provenientes del fago T4 y ARN polimerasas de un fago tipo T3 o T7²⁰².

En plantas, Bergthorsson y colaboradores^{16,194} han reportado la THG masiva –particularmente la THG intradominio– en *Amborella trichopoda*, involucrando la adquisición de la mayoría de sus genes mitocondriales conocidos provenientes de múltiples donadores, principalmente de eudicotiledóneas y musgos, muchos de los cuales son expresados al nivel de transcritos estables detectables²⁹. *Amborella* ha adquirido una o más copias de los 21 de sus 31 genes mitocondriales conocidos, para un total de 26 genes foráneos, representando hasta el año 2004, uno de los casos demostrados en los que se confirma que en esta especie se han detectado proporcionalmente más eventos de THG que otros eucariontes e incluso más que los procariontes examinados¹⁹⁴. Las transferencias incluyen: (1) re-población del genoma

mitocondrial –al recuperar genes que habían sido previamente transferidos al núcleo–; (2) duplicaciones de genes –en donde co-existen tanto copias nativas como foráneas de genes en el mismo genoma–; así como (3) THG quimérica –en donde los genes quiméricos resultantes son mitad nativos-mitad foráneos (mitad monocotiledónea y mitad dicotiledónea)¹⁶, e incluso, representando el único caso demostrado hasta el momento de la expresión de un gen transferido en *Sanguinaria*²⁹.

Estos trabajos demuestran claramente que las plantas intercambian genes vía THG planta-planta (angiosperma-angiosperma, angiosperma-gimnosperma, angiosperma-helecho, musgo-angiosperma)²⁹, particularmente mitocondria-mitocondria. Las mitocondrias de las plantas poseen un sistema activo de internalización de ADN y también éstas regularmente se fusionan, facilitando así la incorporación de genes tanto nativos como foráneos. Además, la transferencia de ADN puede facilitarse por el contacto planta-planta y, aunque no todos los caso de THG involucran al parasitismo como mecanismo de transferencia, varios de los casos de THG reportados en plantas involucran a plantas parásitas como donadoras o como hospederas (revisado en ²⁹). Estos resultados pueden ser el reflejo de una mayor cantidad de genes mitocondriales de angiospermas secuenciados, que al ser contrastados con una menor cantidad de genomas secuenciados, indicaría que en realidad se están subestimando los casos reales de THG en plantas. Si esto resulta cierto, como muchos trabajos así lo indican, nos encontraríamos con que la THG ha impactado substancialmente la evolución de los genomas de las plantas, particularmente en la evolución del genoma mitocondrial. Esto demuestra que la transferencia de material genético es dinámica y, al menos en

plantas, involucra el flujo continuo entre organelos así como entre plantas, facilitado por interacciones cercanas como la THG intracelular y el parasitismo, respectivamente.

El primer caso reportado de la transferencia horizontal de una vía metabólica completa hacia un animal terrestre, en este caso para la biosíntesis *de novo* de la forma activa de la vitamina B₆, ha sido descrito en el nematodo fitoparásito *Heterodera glycines*. En la literatura, se supone que los animales carecen de la vía de síntesis *de novo* de vitamina B₆, con la única excepción verificada de la esponja *Suberites domunculus*. Aunque los genes *HgSNZ* y *HgSNO* de *H. glycines* contienen aspectos típicos de los genes eucariontes como intrones tipo eucarionte, cola poli-A y señal poli-A, evidencias genéticas y filogenéticas apuntan hacia eventos de THG de procariontes, en donde el nematodo formador de quistes de la soya perdió la habilidad para sintetizar la vitamina B₆ junto con el resto de los animales y posteriormente la readquirió de una bacteria, probablemente *Protochlamydia amoebophila*²⁰³.

Recientemente, en el 2008, se describió la THG masiva en rotíferos de la clase Bdelloidea, en la que están involucrados genes procedentes de bacterias, hongos y plantas, concentrado en las regiones teloméricas junto con distintos elementos móviles genéticos. Estos rotíferos son investigados debido al interés evolutivo que genera el que hayan eliminado completamente la reproducción sexual –los machos son desconocidos y las hembras se reproducen exclusivamente por partenogénesis– y sin embargo, se han diversificado en más de 300 especies. Estos organismos responden al estrés ambiental entrando en un estado de latencia conocido como anhidrobiosis, en donde el rotífero se deshidrata y enquistado hasta que las condiciones ambientales son óptimas de nuevo. Cuando se recuperan de la animación suspendida, estos rotíferos

incorporan ADN foráneo mientras reestructuran sus membranas celulares dañadas. Cualquier ADN que se encuentre en proximidad puede ser incluido en el nuevo genoma, incluyendo alimento semi-digerido. En este estudio, algunos de los genes foráneos son defectuosos, mientras que otros están intactos y se transcriben, generando incluso enzimas activas, algunos de estos últimos contienen intrones funcionales. Esta información sugiere que la captura y asimilación funcional de genes foráneos representan una fuerza importante en la evolución de los rotíferos de la clase Bdelloidea¹⁹⁹.

En resumen, los eventos de THG hacia eucariontes no representan eventos raros de transferencias de un solo gen, sino que múltiples genes e incluso vías metabólicas completas procedentes de virus, bacterias, hongos y plantas, han sido transferidos principalmente hacia protistas, plantas y animales (nemátodos e insectos); en algunos casos inclusive, sufriendo proporcionalmente más eventos de THG que otros eucariontes e incluso más que los procariontes examinados a la fecha. Además, la THG representa una fuerza evolutiva que puede facilitar la adquisición o readquisición de características complejas, en uno o varios eventos de THG, lo que puede resultar en ventajas adaptativas inmediatas al hospedero que incorpore THG masiva, incluso resultando en la diversificación de especies.

THG de *Wolbachia* hacia eucariontes

Wolbachia es un grupo de α -proteobacterias heredadas citoplásmicamente entre aproximadamente 20% de las especies de insectos²⁰⁹. Estos endosimbiontes son heredados de forma materna en algunas líneas germinales eucariontes. Los resultados de su infección en testículos y ovarios varían desde mutualismo (en nemátodos hospederos) a parasitismo (en artrópodos hospederos), dependiendo de su interacción simbiótica con el hospedero, e incluyen como parásito reproductivo en artrópodos, las siguientes alteraciones: (1) la eliminación de los machos infectados, permitiendo la supervivencia selectiva de las hembras y hace más probable la reproducción de las hembras aún en ausencia de machos, (2) feminización, ocasionando que los machos infectados crezcan ya sea como hembras completamente fértiles o como pseudo-hembras infértiles, (3) partenogénesis, permitiendo la reproducción asexual de hembras infectadas, (4) incompatibilidad citoplásmica, inhabilitando a los machos infectados con *Wolbachia* para reproducirse exitosamente con hembras libres de infección. Mientras que como mutualista en nemátodos, *Wolbachia* proporciona compuestos como heme, riboflavina y nucleótidos al hospedero^{20,209}.

Actualmente se sabe que el sistema de secreción tipo IV es una vía eficiente mediante la cual las bacterias pueden mediar la THG y de proteínas, hacia las células eucariontes, como lo hace *Wolbachia pipientis*^{210,211}, al igual que otras bacterias intracelulares que ocasionan enfermedades en humanos²¹².

El primer reporte de la THG de un endosimbionte –THG intracelular– hacia un insecto, involucró a la α -proteobacteria endocelular tipo rickettsia del género *Wolbachia* y al escarabajo *Callosobruchus chinensis* (gorgojo del frijol adzuki). Mediante técnicas

específicas de la PCR y análisis de southern blot, Kondo y colaboradores (2002)²⁰⁴ encontraron que el genoma del escarabajo del frijol *C. chinensis* contiene una fracción del repertorio genético de *Wolbachia*, el cual fue transferido al cromosoma X de este insecto hospedero²⁰⁴.

Además, tras detecciones exhaustivas con la PCR para los 222 genes de *Wolbachia* (cepa *wMel*), con el análisis de secuencia de los productos amplificados por PCR y análisis de Southernblot, se sugirió que este escarabajo porta en su genoma nuclear, aproximadamente el 30% de los genes de este endoparásito –en la región proximal de la base del brazo corto de su cromosoma X–. Aparentemente, esta adquisición ocurrió en un solo evento evolutivo de THG de una cepa de *Wolbachia* del grupo A, después de la especiación de *C. chinensis*, hace aproximadamente un millón de años, ya que ni *C. maculatus* ni *C. rhodesianus* (familiares congénicos –organismos genéticamente idénticos que difieren en un locus– de *C. chinensis*) contienen genes transferidos de *Wolbachia*. Por la longitud examinada, una parte de los genes transferidos fueron inactivados por alteraciones estructurales –codones de paro y/o desplazamientos o alteraciones del marco de lectura–, perdiendo su función, liberados de limitaciones funcionales (alcanzando una tasa de evolución neutral), y finalmente, inactivados transcripcionalmente. Por lo tanto, la mayoría si no es que todos los genes transferidos, han sido pseudogenizados. Sin embargo, se demostró que más de la mitad de los genes transferidos de *Wolbachia* son transcripcionalmente activos –como lo mostraron los estudios de RT-PCR y RT-PCR cuantitativo–, aunque con niveles de expresión muy bajos. Cabe resaltar que uno de los aspectos más interesantes de este artículo y que al principio confirmaba observaciones previas del grupo de Kondo con respecto a que

existe una población que representa al 2.9% de *C. chinensis* libre de genes transferidos de *Wolbachia*, al parecer más bien representa variaciones considerables respecto al repertorio de genes de *Wolbachia* transferidos entre las poblaciones de la misma especie²⁸, lo que abre un universo de posibilidades para realizar especulaciones evolutivas acerca de la aparición de nuevas especies.

Además, recientemente se ha reportado que dos genes de origen bacteriano se encuentran altamente expresados en el áfido de chícharos *Acyrtosiphon pisum*, uno de *Wolbachia* y el otro de una bacteria no descrita²⁰⁵, demostrando la plena funcionalidad de los genes adquiridos horizontalmente en eucariontes, por lo que se sugiere que la THG interespecie, particularmente entre hospedero y simbiote, puede tener una importancia significativa en la evolución de las interacciones simbióticas²¹³.

En cuanto a la THG intracelular involucrando a *Wolbachia*, actualmente se ha demostrado la existencia de un gran número de estos eventos en una gran variedad de organismos. Por ejemplo, Fenn y colaboradores (2006)²⁰⁶ han analizado proyectos de secuencia de genomas de insectos y nemátodos, reportando la THG de *Wolbachia*-insecto²⁰⁶. Por mencionar algunos, hasta el momento se han encontrado fragmentos de *Wolbachia* en: (1) moscas de la fruta (*Drosophila ananassae*, *D. sechellia* y *D. simulans*); (2) avispas parasitoides (*Nasonia giraulti*, *N. vitripennis*, *N. longicornis*); (3) nemátodos filariales (*Onchocerca volvulus*, *O. ochengi*, *Brugia malayi*, *B. timori*, *B. pahangi* y *Dirofilaria immitis*); (4) mosquitos (*Aedes aegypti* y *Culex pipiens*); (5) áfidos (*Acyrtosiphon pisum*); y (6) escarabajos (*Callosobruchus chinensis*)^{20,28,204-208}.

Sin embargo, uno de los casos más sorprendentes de THG reportados hasta la fecha, considerando tanto a procariontes como eucariontes, y de la misma magnitud que

aquellas que involucraron la generación del cloroplasto, mitocondria y núcleo, corresponde al caso de la aparente adquisición horizontal del genoma entero de *Wolbachia* por parte de animales, particularmente de *Drosophila ananassae*. Reportada por Hotopp y colaboradores (2007)²⁰, este grupo corrobora –mediante PCR– la transferencia del genoma de *Wolbachia*, hacia los genomas de cuatro especies de insectos y cuatro de nemátodos, encontrándolo desde pequeñas inserciones de 500pb hasta su genoma entero, de más de 1000pb (Figura 5).

Anteriormente, durante la comparación del genoma publicado de *Wolbachia* y datos de secuenciación por el método “*shotgun*” del genoma completo de *Wolbachia* (de moscas de la fruta), se había observado un inserto de gran tamaño de *Wolbachia* en el genoma de *D. ananassae*. Se encontraron numerosas secuencias clones contiguas y superpuestas (*contigs*) que contenían uniones entre retrotransposones de *Drosophila* y genes de *Wolbachia*. La gran cantidad de estas uniones y la profunda cobertura de secuencia de las uniones indicaban que estos insertos probablemente no eran el resultado de librerías quiméricas o de los ensamblajes de secuencia²⁰. Para validar dichas observaciones, el grupo de Hotopp, amplificó mediante PCR, cinco uniones *Drosophila-Wolbachia* y verificaron las secuencias terminales de tres de ellas²⁰. Además, utilizando la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) con sondas marcadas de dos genes de *Wolbachia*, encontraron la presencia de genes de *Wolbachia* en el cromosoma 2L de *D. ananassae*²⁰.

El grupo empleó distintos métodos para verificar la naturaleza del DNA insertado, incluyendo: (1) secuenciación de BACs –cromosomas artificiales bacterianos (abarcando porciones de la inserción)–; (2) secuenciación de porciones abarcando la

inserción; (3) tinción fluorescente del inserto en el bandeo de cromosomas politénicos; (4) análisis de PCR en aislados globales; (5) cruces genéticos –para confirmar la herencia cromosómica parental de los insertos–; y (6) análisis cuantitativo de RT-PCR y 5'-RACE –amplificación rápida de extremos complementarios de ADN 5' (para observar la transcripción de un gen de *Wolbachia* con cubiertas de ARNm post-transcripcionales, que son específicas de la transcripción eucarionte)–²⁰. Mediante estos estudios, reportaron que casi todo el genoma de *Wolbachia* fue transferido al genoma nuclear de la mosca (Figura 5) –evidenciado indirectamente por la presencia de productos aplicados por PCR de 44 de 45 genes de *Wolbachia* distantes físicamente en cepas curadas de *D. ananassae* Hawai (verificadas mediante microscopía, de carecer de endosimbiontes tras el tratamiento con antibióticos). A pesar de no evaluar la presencia de todos los genes de *Wolbachia* en el genoma del insecto, que de acuerdo con datos publicados en la sitio de internet del J. Craig Venter Institute el número total de genes de *W. pipientis wMel* es de 1308), dicho grupo sugiere la transferencia total o cercana al total de su genoma por la alta proporción amplificada de los genes analizados (44 de 45), que están distribuidos a lo largo del genoma de *Wolbachia*²⁰.

Además, utilizando métodos computacionales, detectaron posibles transferencias del genoma de *Wolbachia* en genomas secuenciados de otros tres insectos (*D. sechellia*, *D. simulans* y *Culex pipiens*, moscas de la fruta y mosquito respectivamente). Y no sólo eso, también demostraron la transcripción de algunos de estos genes transferidos de *Wolbachia* en las células eucariontes tratadas con antibióticos y en cepas libres de *Wolbachia*, asegurándose así de que a pesar de que dichas células no estuvieran infectas con la bacteria²⁰, los genes bacterianos se expresaban en eucariontes.

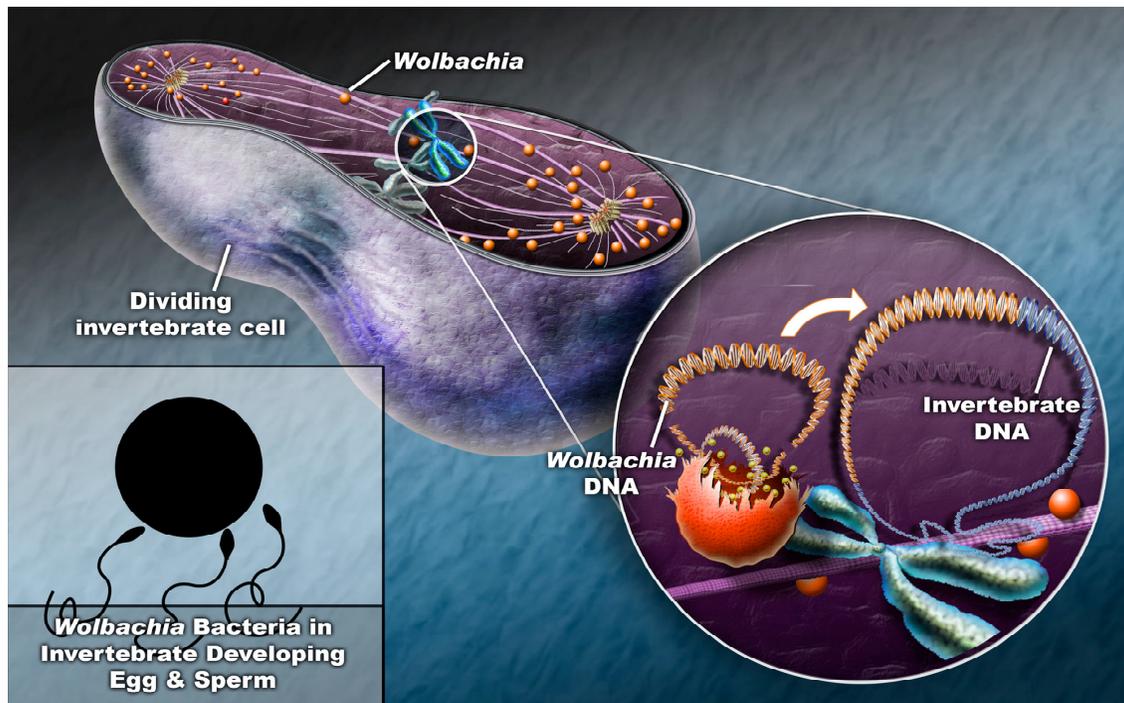


Figura 5. Esquema de la THG –del genoma entero– de una bacteria del género *Wolbachia* hacia el genoma de un eucariote multicelular, la mosca de la fruta *Drosophila ananassae*. *Wolbachia* genes transferring to host's DNA, Nicolle Rager Fuller, National Science University of Rochester (<http://www.rochester.edu/news/show.php?id=2963>)

En resumen, de las 14 secuencias genómicas de eucariontes analizados que naturalmente contienen a *Wolbachia*, 8 mostraron transferencia horizontal de genes; esto implicaría que, al estar presente al menos en el 20% de los insectos, una gran cantidad de genomas eucariontes podrían contener material genético de *Wolbachia*¹⁷. Sin embargo, el resultado más impactante obtenido por el grupo de Hotopp y colaboradores (2007)²⁰, fue la observación de la aparente transferencia del genoma entero de *Wolbachia* insertado en el genoma de la mosca de la fruta *Drosophila ananassae*. El descubrimiento de la presencia de un genoma entero dentro de otro y que algunos de los genes de la bacteria se expresaran en moscas libres de bacterias, acentúa la posible y, anteriormente rechazada, trascendencia de la transferencia lateral

de genes en la evolución genómica eucarionte²⁰. Aunque falta clarificar si en efecto los 1308 genes de *Wolbachia* fueron adquiridos en su totalidad por *D. ananassae*, de corroborarse esto, la THG de *Wolbachia* hacia *Drosophila ananassae* representaría un ejemplo trascendental sobre las posibles consecuencias de la THG en la evolución genómica eucarionte, ya que se demostraría la existencia de la fusión de genomas, no sólo entre procariontes ancestrales, sino también entre procariontes-eucariontes recientes. Este ejemplo podría servir como modelo para el estudio de las consecuencias de la THG en la evolución genómica eucarionte, particularmente respecto a la generación de nuevas especies.

Por otra parte, es prioritario reconocer que, a diferencia de lo ocurrido con la secuencia original del genoma de la mosca de la fruta *D. ananassae*, en el que el enorme inserto de *Wolbachia* fue descartado del ensamble final –a pesar del hecho de que es parte del genoma de la mosca–, en esta ocasión, se diseñaron y realizaron experimentos con la finalidad de resolver dicha interrogante, en lugar de descartarla y desestimarla en automático como comúnmente sucede. Por lo tanto, el argumento de que la falta de genes bacterianos en los genomas ensamblados indican que la THG no ocurre es circular e inválido¹⁷.

La trascendencia del caso de *Wolbachia*, particularmente respecto a *D. ananassae*, reside en que representa el caso reportado más importante de THG involucrando a cualquier organismo hasta ahora analizado, incluyendo tanto a procariontes como eucariontes. Es decir, hasta la fecha se desconoce si algún procarionte ha integrado a su genoma el genoma entero de otro organismo, por lo que ahora podemos argumentar que los hospederos más importantes de THG son los eucariontes y no los procariontes

como antes se presuponía, al menos en cuanto a la cantidad y tamaño de las transferencias.

THG intercelular en plantas y animales: El ADN circulante

Aunque los eventos de THG en humanos reportado por el Consorcio Internacional para la Secuenciación del Genoma Humano han generado controversia, existen muchos datos que demuestran la viabilidad de la THG en humanos, al menos, tratándose de la THG intercelular.

Si los eucariontes son en esencia y origen un ensamble de los componentes de células procariontes entonces, y a menos que éstos se hayan perdido, los mismos mecanismos de THG que producen especiación en bacterias deberían, en principio, operar en estos ensamblajes y los eucariontes poseeríamos la misma capacidad y mecanismos similares para la efectiva THG como los procariontes. En ese sentido, uno de los pasos para que la THG intercelular en eucariontes multicelulares se lleve a cabo, demanda la presencia de ADN extracelular, como una fuente de ADN disponible en distintos fluidos, para su eventual internalización en las células del organismo.

Hace unos sesenta años, poco después de la demostración de que el ADN es el material de la herencia y unos años antes del famoso artículo de Watson y Crick sobre la estructura en doble hélice del ADN, en 1948, Mandel y Métais realizaron el primer trabajo reportando la existencia de ácidos nucleicos libres, ADN y ARN, en la circulación sanguínea tanto de personas sanas como de personas con distintas enfermedades¹³⁶.

No es sino a finales de 1960 cuando tras haber sido olvidado, el ADN circulante es redescubierto en suero y plasma de pacientes con lupus eritematoso sistémico²¹⁴. A partir de ese momento, se ha demostrado la presencia de ADN y ARN circulante en distintos fluidos corporales como sangre, saliva, orina, entre otros, tanto en personas sanas, mujeres embarazadas, personas que han recibido transplantes de órganos, así como en personas con distintas enfermedades: inflamación, infección, insuficiencia cardíaca, insuficiencia respiratoria severa, embolismo pulmonar, enfermedades autoinmunes, cáncer, entre otros^{142,214-244}. Actualmente, distintos grupos de investigación por todo el mundo, trabajan en el desarrollo de la tecnología del ADN circulante como método de diagnóstico, pronóstico y monitoreo de una gran diversidad de condiciones de importancia clínica, cuyo común denominador es la presencia de ADN circulante¹³⁷.

El ADN extracelular circula en la sangre de las personas principalmente: (1) en la forma de mono- y oligo-nucleosomas, asociado a histonas; (2) como ADN de cadena sencilla y ADN de doble cadena; (3) dentro de vesículas con membrana: exosomas, i-somas, cuerpos apoptóticos; (4) asociado a distintas partículas: glicoproteínas, ARN, liposomas, proteínas como la DNA polimerasa y p53, entre otras^{71,105,107,111-113,117,118,124,127,142,153,214,215,227-229,237,241,242,245-248}. El origen de este ADN extracelular corresponde a células normales con núcleo²⁴⁹, células tumorales^{107,136,137,229,239,242,244,248,250}, bacterias^{42,248}, células infectadas por virus^{237,248,251}, ingestión de comida²⁵²⁻²⁵⁹, enucleación de los eritrocitos^{260,261}, así como otras fuentes humanas como la terapia génica, vacunación con DNA, entre otras.

Los mecanismos propuestos para la liberación del ADN circulante, incluyen principalmente: muerte celular (apoptosis y necrosis), lisis de células circulantes, liberación activa y espontánea y, liberación de ADN por estimulación^{116,118,124,127,247,248,262}; además de la enucleación de eritrocitos, que también aporta, aunque sea en menor medida, a la concentración de ADN circulante en los fluidos corporales. Respecto a la liberación activa y espontánea, se ha demostrado que las aurículas –cavidad del corazón que recibe el flujo sanguíneo– de rana, liberan al medio ADN de doble cadena de manera homeostática, sin que exista liberación por parte de aurículas muertas o dañadas^{127,247}. Observaciones semejantes se han realizado en cultivos de linfocitos, fibroblastos de embriones de pollo y en plantas, donde también el ADN recientemente sintetizado es liberado por los protoplastos. En cuanto a la liberación de ADN por estimulación, se ha reportado que el ADN recientemente sintetizado, representando copias extra selectivas de una porción limitada con una complejidad cercana al 10% del genoma constituyendo secuencias que son amplificadas durante el crecimiento celular, es liberado por linfocitos humanos estimulados, demostrando que la excreción de ADN ocurre durante la fase logarítmica de crecimiento celular. Además, las secuencias de ADN excretadas, selectivamente liberadas por linfocitos estimulados y tratados con proteasas, resulta ser un proceso activo que puede ser favorecido e inhibido reversiblemente, sugiriendo una estructura membranal responsable de detonar la liberación de ADN¹²³⁻¹²⁵.

Estas últimas evidencias sugieren un mecanismo regulador bajo el cual algunas, si no es que todas las células, podrían detectar el ADN extracelular del microambiente y, de requerirlo, expulsar ADN independientemente de un efecto mecánico o de la muerte

celular. El papel biológico de la detección y liberación de ADN a la circulación bajo una regulación homeostática aún se desconoce.

Por otra parte, existen varios obstáculos para la permanencia del ADN en circulación sanguínea, como por ejemplo las nucleasas y los macrófagos. Anteriormente, se pensaba que el ADN liberado era rápidamente degradado por las nucleasas. Actualmente, se ha demostrado que en ciertas ocasiones, el ADN y el ARN circulantes pueden escapar a este tipo de degradación; por un lado, en ciertas ocasiones los ácidos nucleicos circulantes se encuentran protegidos, ya sea porque se encuentran dentro de membranas (cuerpos apoptóticos y exosomas) así como por otras proteínas como las histonas. En el caso particular del cáncer, el escape del ADN circulante a la degradación enzimática también es debido, en parte, a que la eficiencia de las nucleasas para eliminar el ADN se encuentra disminuida²⁶³⁻²⁶⁵. Otro obstáculo para la permanencia del ADN en circulación sanguínea son los macrófagos, células vecinas y eritrocitos, quienes para depurar al organismo de los restos celulares, se encargan de fagocitar cuerpos apoptóticos conteniendo entre otras cosas, ácidos nucleicos así como restos celulares. Sin embargo, se puede dar el caso en que por el gran volumen de ADN circulante, los macrófagos resulten insuficientes y/o se encuentren saturados, incapacitados, al menos momentáneamente, para asimilar un mayor volumen de ADN circulante. En el caso particular del lupus eritematoso sistémico, se ha demostrado que la capacidad de los macrófagos²⁶⁶ y los eritrocitos²⁶⁷ para fagocitar el ADN se encuentra disminuida. En ambos casos de depuración del organismo, se debe tomar en cuenta la capacidad de saturación del sistema, por lo que si las concentraciones de ADN circulante son mucho mayores de lo normal, como en las personas enfermas,

probablemente los macrófagos y células vecinas, al igual que las nucleasas, resulten incapaces de encargarse de tanta fuente continua de ADN circulante, como ocurre en el caso del cáncer, en donde a mayor masa tumoral, mayor volumen de ADN circulante. Este volumen de ADN circulante, sumado al ADN circulante proveniente de otras fuentes, incluyendo células normales y bacterias, probablemente saturan el sistema de depuración del organismo y dificulten la eliminación de ADN circulante.

La internalización del ADN circulante se ha estudiado principalmente en plantas y humanos. Actualmente se sabe que las células eucariontes poseen receptores de ADN^{71-73,79,152}, que las células eucariontes internalizan el ADN circulante ya sea mediante estos receptores, con la ayuda de la fagocitosis, por ejemplo, de cuerpos apoptóticos –se ha demostrado la transferencia horizontal de ADN y de oncogenes mediante esta vía^{150,268}– o la internalización completa de bacterias²⁶⁹. Interesantemente, también se ha observado el procesamiento y la expresión del material genético foráneo internalizado tanto en células somáticas como germinales de plantas y animales¹⁴¹, además de su transmisión a la descendencia¹⁷⁰. Cabe resaltar que existe evidencia experimental –en células de mamíferos– que sugiere que el mecanismo de internalización espontánea de ADN de doble cadena es un mecanismo tanto dependiente de la secuencia como específico del tipo celular o tisular⁹⁸.

Reconociendo la existencia de la THG intercelular en humanos, diferentes grupos han planteado distintos acercamientos con la finalidad de dar respuesta a la existencia de un mecanismo celular para censar transferir el ADN extracelular del micro ambiente del organismo y responder si el ADN circulante juega un papel biológico aún desconocido.

Es evidente que los ácidos nucleicos son moléculas informativas y que éstas también se encuentran fuera de las células, disponibles para todas las células del organismo. Tanto Gahan y colaboradores (2003, 2006, 2008)^{120,159,270} con plantas como Adams y colaboradores (1985, 1988)^{145,146} con animales, han planteado que el ADN extracelular, como la molécula informativa que es, estaría fungiendo como un ADN mensajero^{146,159}, capaz de transferir información regulatoria entre las células de forma transitoria¹⁴⁶. Este ADN mensajero puede permanecer en el ambiente, ya sea intra/intercelular, intra/interespecie y/o intraorganísmico, hasta alcanzar un nuevo receptáculo hospedero al cual transmitirle la información.

En cuanto al papel biológico del ADN circulante normal, Yakubov y colaboradores (2002)²⁷¹ sugieren que existe un mecanismo que controla la genética de las células somáticas a nivel organísmico, corrigiendo las mutaciones e induciendo cambios genéticos; en donde los fragmentos genómicos intersticiales y en circulación sanguínea, servirían como moléculas externas de referencia, para asegurar la unicidad genómica de todas las células del organismo^{271,272}. De acuerdo con este mecanismo, algunas de las células del organismo liberarían ADN a la circulación, otras células lo internalizarían y utilizarían como molde patrón al integrar estas secuencias en su genoma, unificando así la información genómica organísmica. En este caso, la THG intercelular de ADN normal, serviría como plantilla para la corrección de alteraciones genómicas en la célula receptora del material genético circulante normal. Existe evidencia de este tipo de reparaciones al ADN mediadas por la THG, particularmente involucrando la THG intercelular. Por ejemplo, Willett-Brozick y colaboradores (2001)²⁷³ han encontrado que el ADN extracromosómico puede contribuir en la reparación de

rompimientos cromosómicos; en particular, se observó la reparación de cromosomas dañados por la inserción de ADN mitocondrial (extracromosómico), evidenciando un mecanismo de inserción previamente desconocido en humanos, por medio del cual los fragmentos extracromosómicos no móviles pueden ser insertados en el genoma (en las uniones de reparación de rompimientos de doble cadena de ADN). De hecho, se trata de la primera observación reportada de una inserción germinal espontánea de secuencias modernas de ADN mitocondrial y sugieren que la reparación de rompimientos de doble cadena participa en la THG inter-organelos *in vivo*²⁷³ o THG intercelular.

Como contraparte del papel biológico de la THG utilizando al ADN circulante como fuente de secuencias normales para la reparación intercelular de alteraciones genómicas propuesto por el grupo de Yakubov, hasta donde sabemos, Bendich y colaboradores (1965)²⁷⁴ fueron los primeros en plantear que el ADN circulante podría ser un factor en la oncogenesis²⁷⁴. También Anker y colaboradores (2004)²⁷⁵, han descrito como transición, al movimiento e inserción de ADN bacteriano hacia células humanas *in vitro*, sugiriendo un papel oncogénico como resultado de dicha THG²⁷⁵ intraorganísmica (ver adelante).

Aunque se sabe de la actividad transformante de los ADN tumorales humanos²⁷⁶, y que mediante la internalización de cuerpos apoptóticos se pueden transferir oncogenes horizontalmente²⁶⁸, hasta la fecha no se ha logrado demostrar *in vivo* que el ADN circulante participa en la carcinogénesis. No obstante, el grupo de García-Olmo (1999, 2001)^{277,278} ha planteado otro acercamiento para discernir la funcionalidad del ADN circulante; particularmente del ADN circulante tumoral y específicamente en la

diseminación del cáncer, en donde las metástasis surgirían como consecuencia de la THG intercelular en células susceptibles de órganos blanco distantes, concretamente de oncogenes dominantes que circulan en la sangre provenientes del tumor primario, esta es la “hipótesis de la genometástasis”^{277,278}.

En México, con la finalidad de explorar el papel biológico del ADN circulante –particularmente en cuanto a su posible participación en cáncer–, el grupo de investigación del Laboratorio de Epigenética y Cáncer de la Unidad de Investigación Biomédica Básica del Instituto Nacional de Cancerología e Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (INCan/IIB), ha realizado experimentos con la finalidad de determinar el posible papel del ADN circulante proveniente de células cancerosas en la transformación celular. Utilizando células de la línea inmortalizada de ratón NIH3T3 como modelo de transformación pasiva y exponerlas al sobrenadante con ADN circulante del cultivo de la línea celular de cáncer de colon humano SW480, se obtuvieron células que al inyectarlas subdérmicamente en ratones desnudos forman tumores, a diferencia de la línea parental NIH3T3 que no forma tumores (Trejo-Becerril, sin publicar).

Además de estos resultados, existen diversos antecedentes que evidencian que la transfección activa de ADN proveniente de células cancerosas obtenido de distintas líneas celulares de orígenes diversos, contribuye la inmortalización de células humanas normales^{279,280}, así como a la transformación de células inmortalizadas²⁸¹⁻²⁸⁷ y normales²⁸⁸ de mamíferos *in vitro*.

Así mismo, para determinar si la THG intercelular mediante ADN circulante proveniente de células cancerosas, es capaz de transformar células humanas normales –que no cuentan con ninguna alteración genética a diferencia de las líneas inmortalizadas que ya cuentan con ciertas alteraciones–, realizamos experimentos de THG intercelular pasiva *in vitro*, mediante la exposición continua de fibroblastos humanos de prepucio de recién nacido normales (BB4ALM) al sobrenadante “transformante” procesado de células cancerosas de la línea celular de cáncer de colon humano SW480 establemente transfectada con el gen GFP (SWGFP). Los resultados de estos experimentos que demuestran la THG intercelular de la línea SWGFP hacia las células humanas normales BB4ALM fueron: (1) expresión de genes transferidos hacia la nueva línea BBSWGFP, tanto de resistencia a geneticina (sobrevivencia al tratamiento) como de la expresión de la proteína verde fluorescente (observación en microscopio de luz UV, ver Figura 6); y (2) Detección mediante PCR para el gen GFP tanto en la línea portadora del gen SWGFP como en la nueva línea receptora del gen BBSWGFP. Mientras que los resultados que demuestran la transformación celular de las células BB4ALM expuestas al sobrenadante “transformante” son: (1) cambios en la morfología celular; (2) la observación de focos de rápido crecimiento que expresaban GFP, lo que se ponía en evidencia mediante la observación en el microscopio de luz UV; (3) la resistencia a la exposición a neomicina; y (4) el desarrollo de tumores subcutáneos cuando fueron inyectados en ratones desnudos. Interesantemente, la exposición de fibroblastos humanos normales al sobrenadante normal a manera de control, resultó en cambios morfológicos anormales. Estos resultados preliminares demuestran que el ADN circulante puede ingresar a las células, expresarse y modificar el comportamiento

celular *in vitro*, algunas veces, comprometiendo la normalidad de las células hospederas que han sufrido THG mutados (Martínez-Ezquerro, sin publicar).

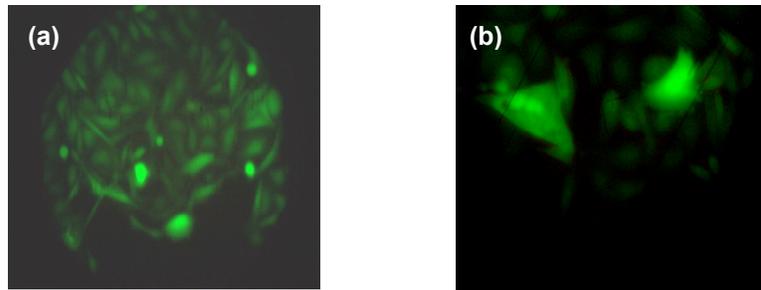


Figura 6. THG intercelular mediante ADN circulante. Fibroblastos humanos normales de prepucio de recién nacido (BB4ALM), tras su exposición al ADN circulante proveniente de la línea celular de cáncer de colon humano SW480, previamente transfectada con el gen de la proteína verde fluorescente (SWGFP), generando así la línea BBSWGFP. Fotografía con microscopio de luz UV de las células BBSWGFP, demostrando la THG intercelular *in vitro* mediante la exposición al ADN circulante proveniente de células tumorales. (a) Microscopio de luz UV 10x. (b) Microscopio de luz UV 40x.

Al mismo tiempo, tratando de determinar si la THG intercelular de ADN circulante proveniente de células cancerosas, al ser transferido horizontalmente, participa en la promoción y/o progresión tumoral, realizamos experimentos de THG intercelular/interespecie *in vivo*, mediante el xenotransplante subdérmico de la línea SWGFP en ratas atímicas tratadas con dos carcinógenos específicos de colon –Azoximetano (AOM) o Dimetilhidrazina (DMH)–, para inducir el cáncer de colon en las ratas y evaluar si la THG mutados provenientes del xenotransplante de la línea SWGFP participan en la promoción y/o progresión de los tumores inducidos. Los resultados macroscópicos de estos experimentos demuestran que: (1) los xenotransplantes formaron tumores subdérmicos que posteriormente fueron eliminados espontáneamente por las ratas; (2) las ratas tratadas con carcinógeno y expuestas al ADN circulante proveniente del xenotransplante, generaron tumores de colon más rápido y más agresivos, que las ratas tratadas únicamente con AOM o DMH; y (3)

durante este experimento (10 meses), las ratas tratadas con carcinógeno y ADN circulante generaron tumores tanto en colon como en diversos órganos, mientras que las ratas tratadas únicamente con AOM o DMH sólo presentaron tumores en el colon. Aunque queda por analizar y demostrar la THG de SWGFP hacia las células tumorales del colon y otros tejidos de las ratas, estos resultados sugieren que el ADN circulante tumoral incorporado por células susceptibles, en este caso por el tratamiento con carcinógenos, participa en la promoción y/o progresión tumoral (Martínez-Ezquerro, sin publicar).

Estos resultados experimentales *in vitro* e *in vivo* son un indicio de la asociación entre la THG intercelular del ADN circulante tumoral y la generación de metástasis (Martínez-Ezquerro, sin publicar).

En resumen, los datos aportados por la investigación en plantas y animales sobre el ADN circulante, proveen evidencia irrefutable de la capacidad celular de estos organismos para liberar, reconocer, internalizar, integrar en su genoma y expresar secuencias de ADN foráneas, provenientes tanto de distintos organismos (bacterias, virus, plantas y animales) como de las mismas células del organismo (THG intercelular). Esto puede ser una evidencia indirecta de que los eucariontes poseemos la misma capacidad y mecanismos similares para la THG que los procariontes, lo que indicaría que sería una característica conservada en todos los organismos. Por otra parte, este material genético foráneo puede ser internalizado no sólo por células somáticas, sino también por células germinales de plantas y animales¹⁴¹ y transmitirse a la descendencia¹⁷⁰. Sin embargo, aún no contamos con estudios sobre la

heredabilidad de los genes propios, ni silvestres ni mutados, transferidos horizontalmente. Esta THG intercelular, resultaría en la alteración genómica de la especie al conferir mutaciones heredables, desde la inserción de pequeñas secuencias hasta la duplicación de genes; las posibles repercusiones positivas, negativas y neutrales, se generarían dependiendo del lugar de inserción de las secuencias y del tipo de genes propios transferidos horizontalmente. Respecto a las consecuencias negativas de la THG intercelular, tendríamos un amplio espectro de posibles resultados, desde la disminución y pérdida de una o varias funciones hasta la letalidad o inviabilidad del organismo. Como posibles consecuencias positivas podrían obtenerse desde ganancia de funciones por duplicación de genes, la diversificación de proteínas y enzimas con mayor actividad hasta la generación de nuevas variantes de proteínas, por ejemplo de anticuerpos que incrementarían la posibilidad de defensa del organismo ante diversos patógenos y la adecuación del organismo. En cuanto a las consecuencias neutrales, las secuencias integradas podrían resultar en la formación de pseudogenes y secuencias repetitivas así como en el incremento del tamaño de los genomas. Tanto las consecuencias neutrales como las positivas y las negativas no letales, tendrían la posibilidad futura de modificar su estadio debido a nuevas mutaciones o reordenamientos genómicos provocados por ejemplo por otras THG.

THG intraorganísmica: el ser humano como nicho ecológico para el ADN extracelular

Para ejemplificar las ventajas de tomar en cuenta esta nueva clasificación en donde planteamos que la THG es un mecanismo global, mencionaremos brevemente un ejemplo de THG intraorganísmica –aquella que ocurre entre los distintos organismos que habitan dentro de un individuo–, en donde observamos que la THG es un mecanismo en donde participan distintos reservorios de ADN y que es facilitado por la cercanía ambiental, en este caso particular, enfocándonos en el ser humano como nicho ecológico para la THG mediante ADN circulante.

Los seres humanos, a lo largo de nuestra vida, entramos en contacto constantemente tanto con virus como con bacterias, así como con diversos eucariontes, principalmente parásitos. Tomando en cuenta al ADN circulante y la THG como una vía natural para la adquisición de genes foráneos, ¿podremos encontrar ejemplos de THG en las comunidades que existen dentro del ser humano?

Zajac y colaboradores (2007)²⁸⁹, al estudiar el ADN bacteriano aislado del tracto digestivo de pacientes con VIH/Sida, encontraron que del 70-100% de las bacterias intestinales de dichos pacientes contenían secuencias del VIH con más del 90% de identidad con tres genes cruciales del VIH-1 (*gag*, *pol*, *env*). Las bacterias que contenían secuencias del VIH-1 fueron en su mayoría *E. coli* (40%), *Proteus mirabilis* (15%), *Citrobacter freundii* (10%), *Staphylococcus sp.* (6%) y *Enterobacter aerogenes* (3%), sirviendo como posibles vectores de transmisión o reservorios del virus²⁸⁹.

Cabe resaltar que durante sus estudios de hibridación (*dot blot hybridization*), utilizando ADN de linfocitos/ADN bacteriano, la señal de hibridación no fue detectada

en muestras de sujetos control con la excepción de las muestras de un sujeto²⁸⁹. Eliminando la posibilidad de contaminación de las muestras, esta observación implicaría que dicho sujeto control es portador de comunidades bacterianas intestinales que contienen secuencias del VIH.

A pesar de que Zajac y colaboradores (2007)²⁸⁹ no discutieron al respecto en dicho artículo, en este ensayo no dejamos pasar esta oportunidad para especular un poco al respecto. Independientemente de lo interesante de sus resultados en cuanto a la THG virus-bacterias facilitada por su cercana interacción al encontrarse dentro de un mismo hospedero, en este caso el ser humano, lo que más me llama la atención es que un sujeto control, es decir, un individuo sano sin VIH/SIDA cuya muestra analizada en los estudios de ADN de linfocitos también resultó negativa para el VIH, resultó portador de una comunidad bacteriana cuyo ADN, al ser analizado, contiene secuencias del VIH.

Como se mencionó previamente, descartando la contaminación de su muestra en la generación de este resultado, estaríamos ante la posibilidad o ante la prueba de la THG intraorganísmica, en donde una comunidad bacteriana adquirió al menos tres genes del VIH-1, probablemente al interactuar dentro de un individuo con VIH/SIDA, y que estas bacterias sobrevivieron y lograron hospedarse posteriormente en una persona sana (sin VIH/SIDA), probablemente mediante el consumo de alimentos contaminados con estas cepa provenientes de individuos con VIH.

Se sabe que la THG –intercelular– del VIH-1 puede ocurrir entre distintos tipos celulares como fibroblastos y células dendríticas mediante la internalización de cuerpos apoptóticos, independientemente de su unión directa a las células CD4²⁹⁰. Sabiendo esto, junto con la aceptación de la THG como un mecanismo ecológico y evolutivo

global (planteado en este ensayo), se esperaría que el grupo de Vladimir Zajac hubiese diseñado un experimento o al menos hubiera discutido un poco respecto a ese resultado tan interesante y enigmático, que hasta el momento continúa sin una clara respuesta.

Como hemos visto en este ensayo, la THG es un mecanismo universal que entre otras cosas, confiere innovación genómica y plasticidad, por lo que probablemente este no sea un caso exclusivo de THG intraorganísmica y la misma situación se repite en otras personas con VIH/SIDA y sus respectivas comunidades bacterianas, representando sólo una fracción de las THG intraorganísmicas en donde el ser humano puede participar como nicho ecológico para el ADN circulante susceptible de ser transferido horizontalmente.

Si extrapolamos estos resultados observados en humanos al resto de organismos multicelulares, estaríamos ante la noción de que el resto de los vertebrados vertebrados, invertebrados, plantas y hongos, pueden estar funcionando al igual que los humanos, como nichos ecológicos del ADN circulante extracelular, facilitando la THG intraorganísmica. Por ejemplo, involucrando a rumiantes, se ha observado que la fracción de genes eucariontes transferidos es mayor en los grupos bacterianos que consisten predominante o exclusivamente de parásitos o simbioses, particularmente las espiroquetas¹⁷², al igual que las transferencias de genes endosimbiontes de origen distinto a los organelos, en algunos animales multicelulares que frecuentemente contienen microorganismos endocelulares, particularmente en el caso de los insectos²⁸. En la THG intraorganísmica el ADN es liberado al ambiente, detectado, reconocido, internalizado, degradado o transferido horizontalmente, integrándose en genomas

hospederos para eventualmente volver a ser liberado, ya sea modificado o intacto, y completar su ciclo. Durante este ciclo del ADN circulante, el material genético está sujeto a presiones de selección y otros procesos evolutivos que podrían resultar en la eliminación o conservación de estas secuencias genómicas circulantes transferibles.

Discusión

La THG entre bacteria-bacteria y entre bacteria-arquea ha sido aceptada por muchos años. En el pasado, los más valientes y aventurados mencionaban la rara posibilidad de THG entre bacterias y eucariontes unicelulares, principalmente fagotróficos, mientras que la mayoría la rechazaba^{3,5,14-32}.

Actualmente y gracias a los recientes descubrimientos e insistencia experimental, particularmente del grupo de Hotopp y colaboradores (2007)²⁰, resulta evidente e indiscutible, la existencia a gran escala de la THG de bacterias hacia eucariontes multicelulares.

Clasificación ecológica de la THG

Anteriormente se han utilizado clasificaciones taxonómicas como las vistas a lo largo de este ensayo para referirse a la THG, en donde se resalta la observación de estos eventos en procariontes, mientras que en eucariontes eran prejuizados como raros y ocasionales. Sin embargo, en este ensayo se ha dejado en claro que la THG es un mecanismo global que también afecta a los eucariontes. Por ello, esta nueva clasificación pretende facilitar el estudio de la THG, al entenderla como un fenómeno ecológico y evolutivo, natural y global. Ya no se centra exclusivamente en los organismos u organelos involucrados en la transferencia horizontal, sino que se concentra en las diversas interacciones con las que se obtiene el material genético foráneo.

Esta clasificación ecológica de la THG está basada en la interacción entre la fuente del ADN transferible y el genoma hospedero. Las categorías principales que la conforman son las siguientes:

- THG intragenómica: involucrando el traslado de material genético (elementos transponibles) dentro un mismo genoma.
- THG intracelular: se refiere al intercambio de secuencias genéticas entre los organelos de una célula.
- THG circulantes: involucrando el material genético extracelular propio o ajeno (transplantes y transfusiones sanguíneas), normal y mutado, que circula en distintos fluidos dentro de los eucariontes multicelulares y se transfiere entre sus propias células, somáticas y germinales.
- THG ambientales: que aunque procedentes de distintos organismos, están presentes de manera extracelular en distintos ambientes: terrestres, acuáticos y extremos; por ejemplo, en sedimentos y columnas de agua marina²⁹¹⁻²⁹³, suelo y sedimentos¹³³, acuíferos subterráneos¹³⁴, lagos hipersalinos²⁹⁴, sedimentos congelados (*permafrost*)^{295,296}, entre otros, y que pueden ser internalizados por diversos organismos que interaccionan en ellos.
- THG alimenticios: es decir, la transmisión de secuencias genéticas proveniente de la dieta del organismo.
- THG simbiotes: intercambio de material genético entre los organismos simbiotes intra y extracelulares.
- THG parásito-hospedero: flujo de secuencias genéticas entre el parásito (virus, bacterias y eucariontes) y el hospedero.

- THG artificial: involucrando el material genético aislado de distintos organismos y combinado mediante ingeniería genética, para transferir genes mediante vectores artificiales –que combinan partes de vectores naturales infecciosos como los virus, plásmidos y transposones– y generar organismos genéticamente modificados, así como el generado por transplantes de órganos y transfusiones sanguíneas.

Tanto con la THG circulantes así como con las THG ambientales, alimenticios, simbioses y parásito-hospedero, la transferencia afectaría, al menos, al genoma de una o varias células del organismo hospedero, probablemente con mayor frecuencia a las células somáticas, y no necesariamente a las células germinales. Si bien la THG a células germinales resultaría en un efecto claro y más fácilmente analizable en la descendencia del organismo, la THG también podría ser evaluada en la descendencia de células somáticas que hayan adquirido ADN foráneo. Previamente mencionamos que el material genético foráneo también puede ser internalizado por células germinales de plantas y animales¹⁴¹ y transmitirse a la descendencia¹⁷⁰; pero aunque que esto podría resultar en un efecto claro y detectable al estudiar estos tipos de THG en la descendencia, hay muy pocos estudios respecto a estos tipos de THG en eucariontes, por lo que es necesario un mayor esfuerzo de investigación en esta área, ya que por ejemplo los artículos que se han publicado al respecto se enfocan al estudio de transferencias entre organismos distantemente relacionados, mientras que hasta la fecha no existen estudios sobre la heredabilidad de THG circulantes.

Con esta clasificación ecológica de la THG, se pretende eliminar la concepción errónea que anteriormente ha hecho referencia a la THG hacia eucariontes como eventos individuales, casuales y raros. En lugar de eso, esta nueva clasificación acepta a la THG como un acontecimiento global que involucra a todos los reservorios genómicos y define a la THG como un evento ecológico y evolutivo global que afecta a todos los organismos. De esta forma, se facilita el estudio de la THG ya que, además de poder incorporar otras categorías y subdivisiones, se puede seleccionar el grado de complejidad que determinado acercamiento pretende explorar, tomando en cuenta las diversas interacciones de virus, bacterias y células, pasando por organismos y comunidades, hasta ecosistemas. Esta clasificación ecológica podría lograr la generalización del entendimiento de la THG como un fenómeno global y natural que involucra a todos los reservorios de ADN.

Como mencionamos previamente, los eventos de THG también se pueden clasificar considerando la naturaleza del material transferido, en tres categorías básicas^{8,20,38}: (a) adquisición de genomas; (b) adquisición de genes –nuevos o readquiridos, parálogos (de genes existentes), xenólogos (de otras especies) y ortólogos (reemplazo de genes existentes pero de otro linaje)–; y (c) adquisición de secuencias no codificantes –genes incompletos o dañados, elementos móviles, entre otros.

Esto significa que existe evidencia directa e indirecta de que el material genético es transferido horizontalmente hacia otros organismos de manera funcional, desde pequeños fragmentos hasta, aparentemente, genomas enteros. Probablemente, la mayor proporción de THG involucra a las secuencias no codificantes, mucho más

pequeñas que un gen y más aún que un genoma completo; sin embargo, una gran cantidad de eventos de THG hacia eucariontes involucra genes enteros implicados en el metabolismo que son integrados y utilizados por los organismos hospederos.

Detección de eventos de THG en eucariontes

Como vimos al principio de este ensayo, existen distintas complicaciones para la detección de la THG; particularmente, los estudios filogenéticos requieren un muestreo taxonómico amplio, para poder encontrar eventos de THG de manera certera; además, por comodidad o facilidad, su búsqueda se ha centrado casi exclusivamente en eventos de THG entre organismos distantemente relacionados.

Anteriormente, se ha sugerido que las células de mamíferos han desarrollado distintos mecanismos de defensa contra la internalización, integración y expresión del ADN foráneo. De acuerdo con Jonas y colaboradores (2001)²⁹⁷ se cree que estos mecanismos de defensa son: (a) la degradación y/o excreción del ADN foráneo, (b) excisión y pérdida del ADN integrado previamente del genoma hospedero y (c) la inactivación dirigida de los genes foráneos, mediante la metilación específica de secuencia (inactivación epigenética)²⁹⁷.

También se han mencionado barreras para la THG hacia células germinales –barrera hemato-testicular y hemato-folicular–, sin embargo, se ha demostrado que esta “barrera germinal” más bien podría ser una complicación que no impide la THG hacia las células germinales de plantas y animales¹⁴¹, como tampoco la impide la “barrera hemato-encefálica”¹⁶⁵. Además, tanto humanos como otros vertebrados podrían sufrir THG en

el embrión en desarrollo e incluirse en parte de sus células somáticas –mosaicismo o quimeras– sin que las células gaméticas estén directamente involucradas.

A pesar de que existen dificultades y mecanismos de defensa contra la THG, como vimos anteriormente, la THG hacia eucariontes es un fenómeno natural generalizado que probablemente, en efecto, sea frenado en cierta medida por distintos mecanismos celulares y moleculares, pero sin evitarlo en su totalidad. Además, los diversos estudios del ADN circulante en plantas y animales, en combinación con su estudio en la salud humana, han demostrado la existencia de un mecanismo global que permite la THG en eucariontes, por lo menos, tratándose de la THG circulantes, THG alimenticios y THG parásito-hospedero.

THG en eucariontes

Hasta el momento, se han reportado casos de THG procedentes tanto de procariontes como de eucariontes hacia: protistas, algas, briofitas (musgos), pteridofitas (helechos), gimnospermas, angiospermas, hongos, invertebrados marinos (moluscos), insectos, gusanos, anfibios, reptiles y mamíferos.

Además, el descubrimiento y confirmación de la transferencia del genoma de *Wolbachia* hacia ocho genomas animales hospederos –cuatro especies de insectos y cuatro de nemátodos–, encontrándolo desde pequeñas inserciones de 500pb hasta su genoma entero²⁰, aparentemente, sumado al creciente reporte de otros casos de THG parásito-hospedero involucrando a *Wolbachia* por distintos grupos científicos, probablemente comprendan sólo una pequeña fracción –la punta del *iceberg*– del número real de transferencias entre endosimbiontes reproductivos y sus hospederos

eucariontes, ya que *Wolbachia pipientis* es el patógeno endosimbionte más común del reino animal, encontrándose en el 70% de los animales invertebrados; infectando y siendo heredado de forma materna a una gran cantidad de artrópodos, incluyendo al menos el 20% de las especies de insectos, así como de nematodos²⁰.

Estos descubrimientos involucrando a *Wolbachia* demuestran que en la naturaleza existen eventos de asimilación de genes y, aparentemente también de genomas, en asociaciones entre animales y procariontes¹⁷, por lo que mientras las secuencias bacterianas sigan siendo excluidas rutinariamente de los ensamblajes genómicos sin realizar ninguna verificación experimental, las transferencias horizontales de genes de bacterias a genomas eucariontes continuarán siendo difíciles de encontrar.

En ese sentido, aunque hace algún tiempo, los resultados de la secuenciación del genoma humano sugerían la posibilidad de la THG bacteriana hacia el genoma humano, esta posibilidad ha resultado controvertida por los resultados de análisis filogenéticos. Sin embargo, podemos aprender de lo ocurrido con el caso de *Wolbachia-Drosophila* en donde en algún tiempo se descartaron fragmentos de *Wolbachia* como pertenecientes a *Drosophila*, aludiéndolos a contaminación de las muestras. Además, los estudios del ADN circulante conjuntados con el análisis de su repercusión en la salud humana, han puesto de manifiesto la viabilidad y existencia actual y continua de la THG en mamíferos terrestres, incluyendo humanos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Debido al escaso muestreo taxonómico actual, el análisis filogenético no permite un análisis preciso de posibles eventos de THG hacia humanos. Sin embargo, afortunadamente existen otros acercamientos para el estudio de eventos de THG en

humanos, cuya finalidad no era la de estudiar la THG, pero que demuestran de manera directa e indirecta la THG, al menos de la THG circulantes en humanos, cuyas consecuencias evolutivas aún faltan por clarificar. Como por ejemplo en el caso del cáncer, donde a pesar de involucrar secuencias de la misma especie –lo que imposibilitaría su diferenciación como posible evento de THG utilizando una aproximación filogenética–, la detección de eventos actuales de THG es facilitada por la posibilidad de rastrear el traslado de secuencias normales y mutadas de una célula a otra, por ejemplo, dentro de cuerpos apoptóticos^{150,268}.

Por otro lado, desde hace tiempo se reconoció la correlación de los virus con el cáncer, y actualmente se sabe que distintos tumores surgen como consecuencia de la THG, particularmente de virus y su integración al genoma hospedero, así como su expresión en distintos tipos celulares²⁹⁸⁻³⁰⁰. Además, se ha sugerido que la inmortalización de células humanas normales ocurre por la transferencia horizontal de secuencias citoplásmicas estrechamente asociadas a proteínas –prácticamente exclusivas de células tumorales– (formando complejos ADN-proteína mediante enlaces covalentes)³⁰¹, debido a la inactivación por inserción o por la supresión funcional de genes requeridos en la senescencia o la muerte celular programada²⁸⁸.

Respecto a la THG hacia las células somáticas, es evidente que su detección e impacto evolutivo resultarían mucho más difíciles de evaluar, sobre todo, tratándose de la THG circulantes. En cuanto a este tipo de THG, los estudios comienzan a dar respuestas respecto a sus consecuencias a corto plazo, principalmente mediante estudios sobre su impacto en la salud del organismo y particularmente en su participación en la generación de enfermedades como el cáncer en humanos. Sin

embargo, existen algunos casos que necesitan analizarse detenidamente para evaluar el posible impacto evolutivo de la THG circulantes hacia células somáticas, particularmente respecto a la posible generación de nuevas especies (ver adelante). Este tipo de estudios implicarían un nuevo acercamiento al fenómeno, que ni siquiera podría hipotetizarse si no entendemos a la THG como un fenómeno global que afecta a todos los reservorios de material genético.

Antes de descartarla, otra consideración que debemos hacer al hablar de la THG circulantes involucrando células somáticas, es que aunque en general las células somáticas hospederas del material genético transferido se perderían con la muerte del organismo que las porta, estas transferencias serían relevantes para la posterior evolución del linaje que las tenga. Al respecto, puedo presentar tres ejemplos involucrando mamíferos en donde las células somáticas de un organismo evolucionaron generando un parásito transmisible: la enfermedad tumoral del demonio de tasmania, el tumor venéreo transmisible canino y una enfermedad similar en hamsters³⁰²⁻³⁰⁶. Estos interesantes descubrimientos, apoyan una de las tesis planteadas en este ensayo respecto a la importancia de considerar a la THG circulantes hacia células somática en el estudio de los procesos evolutivos, así como sus consecuencias en la generación de nuevos organismos y genomas.

Lo que sí está claro es que la THG ocurre de manera espontánea, alcanza células germinales y puede heredarse; por lo tanto, aunque en el corto plazo las transferencias horizontales de este tipo pudieran no ser tan impactantes, en el largo plazo, aunque fueran “pequeñas” pero continuas, estas transferencias podrían estar participando en la

evolución de los organismos en la misma mediada o de forma análoga a las mutaciones generadas por ejemplo, por la tasa de error de la polimerasa.

Ahora, gracias a la enorme cantidad de información que logramos integrar en este trabajo, resulta claro e indiscutible que la THG es un mecanismo global que involucra a todos los organismos, desde virus hasta eucariontes multicelulares.

Consecuencias de la THG en eucariontes

Al igual que entre procariontes, el traslado de información genética ha tenido distintas consecuencias entre los eucariontes, desde configuraciones genómicas –modificación del tamaño, estructura y diversidad genómica–, hasta consecuencias fenotípicas y ecológicas –generación de estructuras especializadas y facilitación para ocupar nuevos nichos.

En términos generales y al igual que como impacta a los procariontes, la THG tiene tres consecuencias en la evolución genómica eucarionte: negativa, neutral y positiva. Cuando una secuencia de material genético foránea se integra en un genoma hospedero alterando su información genética de tal forma que compromete la sobrevivencia del hospedero, se trata entonces de una consecuencia negativa de la THG. Las repercusiones neutrales son aquellas que aparentemente, al menos por largos periodos de tiempo, ni perjudican ni benefician la adecuación del hospedero, pero que podrían representar la consecuencia evolutiva más importante de la THG en los genomas hospederos, al contribuir con la mayor cantidad de cambios genómicos selectivamente neutrales, incrementando la diversidad genómica. Mientras que las

consecuencias positivas son aquellas que resultan de mutaciones o THG que aportan ventajas y benefician al hospedero de distintos modos.

Todas las THG están sujetas a los procesos evolutivos, por lo que la selección natural, purificadora y positiva, así como la neutral, determinan el desenlace de las transferencias en los hospederos. Para ser fijado en la población de una especie, el gen o los genes transferidos horizontalmente deben proveer un beneficio selectivo, que a su vez requiere una presión de selección o pueden fijarse mediante deriva génica. Pero aunque la evolución genómica puede estar dominada por la deriva génica, los cambios a nivel fenotípico probablemente sean dominados por la selección natural más que por deriva génica. Es por ello que gran cantidad de los eventos de THG detectados, incluyen genes involucrados en metabolismo. Por ejemplo, encontramos que la THG es un mecanismo que permite a los linajes la adquisición de genes homólogos de función similar o la readquisición de rasgos y capacidades perdidas por los ancestros; además, provee de nuevas funciones (innovación genómica), optimización y plasticidad, modifica el genoma, facilita la comunicación simbiote-hospedero, facilita la transición de estilos de vida y ocupación de nuevos nichos; también, puede generar la inactivación por inserción o supresión funcional de genes y provocar resultados letales.

Una gran cantidad de THG, involucran genes que participan en el metabolismo, por lo que el organismo hospedero puede beneficiarse con la adquisición de nuevas características que le faciliten degradar diferentes sustratos (catabolismo), así como

sintetizar diversas moléculas (anabolismo), permitiéndole sobrevivir, desarrollarse y reproducirse en un nuevo ambiente o en un ambiente en constante cambio.

El estudio de protozoarios parásitos de importancia médica como *T. vaginalis*, *E. histolytica*, *C. parvum*, *P. falciparum*, entre otros, ha contribuido al reconocimiento e importancia de la THG hacia eucariontes, involucrando la adquisición de genes de metabolismo que contribuyen al estilo de vida parasítico. Por ejemplo, la adquisición de la enzima N-acetilneuraminato liasa por THG de parásitos bacterianos epiteliales de vertebrados, le permitió a *T. vaginalis* evadir y resistir al sistema inmune y nutrirse del hospedero vertebrado parasitado¹⁸. Otras THG contribuyeron a sus funciones respiratorias¹⁷⁴ y para sobrevivir la exposición al oxígeno en ambientes anaeróbicos¹⁷⁵, facilitando su adaptación como parásito de vertebrados. Estos ejemplos resaltan la contribución de la THG en la evolución genómica eucarionte, al facilitar la adquisición de características que otros organismos ya emplean y que pueden favorecer el aprovechamiento de nuevos recursos, así como la adaptación a nuevos nichos y estilos de vida. En muchas ocasiones, predomina la THG entre organismos que comparten nichos ecológicos similares, lo que podría considerarse como un factor importante en la evolución de asociaciones simbióticas como el parasitismo.

Por otra parte, el caso de *Paulinella chromatophora* representa una oportunidad extraordinaria para analizar, prácticamente en tiempo real, las consecuencias de la THG en la evolución genómica eucarionte. Particularmente, el proceso de asimilación de una cianobacteria endosimbionte, ya que éste podría resultar en la generación de una nueva especie de ameba, lo que representaría un punto a favor y actual a la teoría de la simbiogénesis –teoría evolutiva que argumenta que la simbiosis es una fuerza

primaria de la evolución, con la cual surgen nuevos organelos, nuevos cuerpos, nuevos órganos y nuevas especies, mediante la fusión de organismos independientes–, es decir, la generación de nuevas especies mediante la fusión de genomas, formulada por primera vez por K. S. Mereschkovsky (1926) e Ivan Wallin (1927), y desde hace varios años impulsada por Lynn Margulis³⁰⁷.

Además, como hemos puntualizado, existen THG –particularmente la THG circulantes– que aunque no necesariamente se fijan en la población (conjunto de individuos de la misma especie), estas transferencias de material genético pueden ser adquiridas, persistir y ser heredadas por poblaciones celulares somáticas de un mismo individuo. En este sentido, se ha demostrado en células humanas, por ejemplo, la detección y reconocimiento del ADN extracelular bacteriano o viral, detonando una respuesta inmune^{85,86}. También se ha observado la transferencia de información por THG circulantes, de linfocitos B a linfocitos T en el curso de una respuesta inmune^{308,309}. Mientras que los ratones desnudos, tras ser inyectados con el ADN liberado por linfocitos T humanos estimulados con antígeno, producen anticuerpos específicos expresando características (alotipos) humanas^{310,311}. Estos datos indican que el ADN circulante es utilizado como molécula informativa que puede ser aprovechada mediante THG por las células del sistema inmunológico hospedero para la defensa del organismo. Entonces, las consecuencias de la THG circulantes en células somáticas incluyen desde la generación de nuevos genomas y organismos hasta el incremento de la adecuación mediante la diversificación genómica de la respuesta inmune, favorecida por la comunicación celular mediada por THG circulantes (ADN mensajero), tras ser detonada por diversas moléculas y agentes biológicos.

Conclusiones

Desde hace mucho tiempo, la THG hacia procariontes es un acontecimiento completamente aceptado por la comunidad científica y, como hemos visto en este ensayo, este fenómeno debe aceptarse mínimo de igual forma en eucariontes; no sólo por tratarse claramente de un fenómeno que ocurre de manera global en estos organismos, sino también porque es en los eucariontes y no en los procariontes en donde observamos los eventos de THG más significativos, abarcando desde pequeñas secuencias no codificantes hasta la transferencia horizontal de genomas enteros.

Las clasificaciones nos ayudan en nuestro acercamiento del estudio de diversos fenómenos complejos; mientras estén más cercanas a lo que ocurre en realidad, los distintos fenómenos pueden ser más fácilmente asimilados, estudiados, interpretados, analizados, descifrados y comprendidos. Por ello, la clasificación ecológica presentada en este ensayo pretende facilitar la comprensión de la THG como un fenómeno natural y global, enfatizando, si no todos, al menos los nichos más claros en donde encontramos material genético disponible para su transferencia horizontal, desde virus y procariontes, hasta organelos, células, tejidos, fluidos y organismos eucariontes, así como distintos ambientes. Además, compartimentalizado o no, el ADN sigue siendo una molécula informativa que puede ser decodificada por un futuro hospedero. Por lo tanto, esta clasificación puntualiza la interacción de los distintos reservorios de material genético, tanto de ADN compartimentalizado –virus, bacterias, células y organelos de eucariontes–, como de ADN extracelular –ambiente (nichos ecológicos, poblaciones, comunidades, ecosistemas) y organismos (diversos fluidos). Así, el análisis de estas interacciones que facilitan la THG, generando modificaciones genómicas y confiriendo

tanto desventajas como ventajas adaptativas en los hospederos, proporcionará un mayor entendimiento de las repercusiones tanto moleculares y genéticas como ecológicas y evolutivas de la THG.

Cabe señalar que la THG es un proceso que se suma, entre otros, al sintetizado por Darwin, quien presentaba a la selección natural como un proceso lento, estable, gradual y continuo en donde la Naturaleza no da saltos. La THG representa un mecanismo evolutivo significativo, en donde la adquisición de secuencias, genes, vías metabólicas e incluso genomas enteros foráneos por distintos genomas hospederos, genera tanto desventajas como ventajas. Las mutaciones y variabilidad genómica incorporadas pueden facilitar la adaptación de los genomas y organismos hospederos gracias a las nuevas funciones y características obtenidas, previamente probadas y afinadas por otro organismo y disponibles para la THG, generando así procesos evolutivos graduales y continuos y posibilitando saltos evolutivos.

Por último, ahora podemos asegurar que mientras haya material genético disponible, compartimentalizado o extracelular, así como un hospedero que incorpore dicho material genético, podemos asegurar que ha existido, y existirá la transferencia horizontal de genes como un fenómeno ecológico y evolutivo que afecta a todos los organismos.

Referencias

1. Woese, C. R. & Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5088-5090 (1977).
2. Gogarten, J. P. Horizontal gene transfer - a new paradigm for biology. *Evolutionary Theory. Esalen Invitational Conference* (2000).
3. Gogarten, J. P. Gene transfer: gene swapping craze reaches eukaryotes. *Current Biology* **13**, R53-R54 (2003).
4. Low, K. B. & Porter, D. D. Modes of gene transfer and recombination in bacteria. *Annual Review of Genetics* **12**, 249-287 (1978).
5. de la Cruz, F. & Davies, J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology* **8**, 128-133 (2000).
6. Kanhere, A. & Vingron, M. Horizontal gene transfers in prokaryotes show differential preferences for metabolic and translational genes. *BMC Evolutionary Biology* **9**, 9-22 (2009).
7. Nelson, K. E. *et al.* Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**, 323-329 (1999).
8. Koonin, E. V., Makarova, K. S. & Aravind, L. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annual Review of Microbiology* **55**, 709-742 (2001).
9. O'Connell, D. A gift from afar. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 668 (2005).
10. Ponting, C. P., Aravind, L., Schultz, J., Bork, P. & Koonin, E. V. Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. ancient ancestry and horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology* **289**, 729-745 (1999).
11. Gogarten, J. P., Doolittle, W. F. & Lawrence, J. G. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 2226-2238 (2002).
12. Beiko, R. G., Harlow, T. J. & Ragan, M. A. Highways of gene sharing in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14332-14337 (2005).
13. Gogarten, J. P. & Townsend, J. P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 679-687 (2005).
14. Andersson, J. O., Doolittle, W. F. & Nesbo, C. L. Genomics: Enhanced: Are there bugs in our genome? *Science* **292**, 1848-1850 (2001).
15. Andersson, J. O. Lateral gene transfer in eukaryotes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**, 1182-1197 (2005).
16. Bergthorsson, U., Adams, K. L., Thomason, B. & Palmer, J. D. Widespread horizontal transfer of mitochondrial genes in flowering plants. *Nature* **424**, 197-201 (2003).
17. Bordenstein, S. R. Evolutionary genomics: transdomain gene transfers. *Current Biology* **17**, R935-R936 (2007).
18. de Koning, A. P., Brinkman, F. S. L., Jones, S. J. M. & Keeling, P. J. Lateral gene transfer and metabolic adaptation in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 1769-1773 (2000).
19. Denker, E., Baptiste, E., Le Guyader, H., Manuel, M. & Rabet, N. Horizontal gene transfer and evolution of cnidarian stinging cells. *Current Biology* **18**, R858-R859 (2008).
20. Hotopp, J. C. D. *et al.* Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* **317**, 1753-1756 (2007).
21. Huang, J. & Gogarten, J. P. Concerted gene recruitment in early plant evolution. *Genome Biology* **9**, R109 (2008).
22. Keeling, P. J. & Palmer, J. D. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics* **9**, 605-618 (2008).

23. Keen, N. T. & Roberts, P. A. Plant parasitic nematodes: digesting a page from the microbe book. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4789-4790 (1998).
24. Kurland, C. G. Something for everyone - Horizontal gene transfer in evolution. *EMBO Reports* **1**, 92-95 (2000).
25. Kurland, C. G., Canback, B. & Berg, O. G. Horizontal gene transfer: A critical view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 9658-9662 (2003).
26. Martin, W. Molecular evolution: Lateral gene transfer and other possibilities. *Heredity* **94**, 565-566 (2005).
27. Mitreva, M., Smant, G. & Helder, J. Role of horizontal gene transfer in the evolution of plant parasitism among nematodes. *Methods in Molecular Biology* **532**, 517-535 (2009).
28. Nikoh, N. *et al.* *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. *Genome Research* **18**, 272-280 (2008).
29. Richardson, A. O. & Palmer, J. D. Horizontal gene transfer in plants. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1-9 (2007).
30. Salzberg, S. L., White, O., Peterson, J. & Eisen, J. A. Microbial genes in the human genome: lateral transfer or gene loss? *Science* **292**, 1903-1906 (2001).
31. Stanhope, M. J. *et al.* Phylogenetic analyses do not support horizontal gene transfers from bacteria to vertebrates. *Nature* **411**, 940-944 (2001).
32. Syvanen, M. Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences. *Annual Review of Genetics* **28**, 971-980 (1994).
33. Katz, L. A. Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1893-1900 (2002).
34. Ohyanagi, H., Ikeo, K. & Gojobori, T. The origin of nucleus: rebuild from the prokaryotic ancestors of ribosome export factors. *Gene* **423**, 149-152 (2008).
35. Horiike, T., Hamada, K. & Shinozawa, T. Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of archaea in bacteria supported by the newly clarified origin of functional genes. *Genes & Genetic Systems* **77**, 369-376 (2002).
36. Horiike, T., Hamada, K., Kanaya, S. & Shinozawa, T. Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of archaea in bacteria is revealed by homology-hit analysis. *Nature Cell Biology* **3**, 210-214 (2001).
37. Doolittle, W. F. You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends in Genetics* **14**, 307-311 (1998).
38. Barkman, T. *et al.* Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 248-263 (2007).
39. Drlica, K. A. & Kado, C. I. Crown gall tumors: are bacterial nucleic acids involved? *Bacteriological Reviews* **39**, 186-196 (1975).
40. Stroun, M., Anker, P., Gahan, P., Rossier, A. & Grishin, N. V. *Agrobacterium tumefaciens* ribonucleic acid synthesis in tomato cells and crown gall induction. *Journal of Bacteriology* **106**, 634-639 (1971).
41. Stroun, M., Anker, P. & Auderset, G. Natural release of nucleic acids from bacteria into plant cells. *Nature* **227**, 607-608 (1970).
42. Stroun, M. & Anker, P. Bacterial nucleic acid synthesis in plants following bacterial contact. *Molecular and General Genetics* **113**, 92-98 (1971).
43. Wullems, G. J., Molendijk, L., Ooms, G. & Schilperoort, R. A. Differential expression of crown gall tumor markers in transformants obtained after *in vitro* *Agrobacterium tumefaciens*-induced transformation of cell wall regenerating protoplasts derived from *Nicotiana tabacum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 4344-4348 (1981).

44. Yajko, D. M. & Hegeman, G. D. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: specific transfer of bacterial deoxyribonucleic acid to plant tissue. *Journal of Bacteriology* **108**, 973-979 (1971).
45. Meins Jr, F. Evidence for the presence of a readily transmissible oncogenic principle in crown gall teratoma cells of tobacco. *Differentiation* **1**, 21-25 (1973).
46. Lacroix, B., Tzfira, T., Vainstein, A. & Citovsky, V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *Trends in Genetics* **22**, 29-37 (2005).
47. Tzfira, T., Rhee, Y., Chen, M. H., Kunik, T. & Citovsky, V. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: The molecules that walk through the walls. *Annual Review of Microbiology* **54**, 187-219 (2000).
48. Citovsky, V. & Zambryski, P. Transport of nucleic acids through membrane channels: snaking through small holes. *Annual Review of Microbiology* **47**, 167-197 (1993).
49. McCullen, C. A. & Binns, A. N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**, 101-127 (2006).
50. Christie, P. J. & Cascales, E. Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Molecular Membrane Biology* **22**, 51-61 (2005).
51. Cascales, E. & Christie, P. J. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**, 1170-1173 (2004).
52. Monier, A. *et al.* Horizontal gene transfer of an entire metabolic pathway between a eukaryotic alga and its DNA virus. *Genome Research* **19**, 1441-1449 (2009).
53. Jankowski, J. M., States, J. C. & Dixon, G. H. Evidence of sequences resembling avian retrovirus long terminal repeats flanking the trout protamine gene. *Journal of Molecular Evolution* **23**, 1-10 (1986).
54. Moir, R. D. & Dixon, G. H. A repetitive DNA sequence in the salmonid fishes similar to a retroviral long terminal repeat. *Journal of Molecular Evolution* **27**, 1-7 (1988).
55. Feschotte, C. Virology: Bornavirus enters the genome. *Nature* **463**, 39-40 (2010).
56. Daniels, S. B., Peterson, K. R., Strausbaugh, L. D., Kidwell, M. G. & Chovnick, A. Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species. *Genetics* **124**, 339-355 (1990).
57. Ribet, D., Harper, F., Dewannieux, M., Pierron, G. & Heidmann, T. Murine MusD retrotransposon: Structure and molecular evolution of an "intracellularized" retrovirus. *Journal of Virology* **81**, 1888-1898 (2007).
58. Yano, S., Panbehi, B., Das, A. & Laten, H. Diaspora, a large family of Ty3-gypsy retrotransposons in *Glycine max*, is an envelope-less member of an endogenous plant retrovirus lineage. *BMC Evolutionary Biology* **5**, 30-44 (2005).
59. Pritham, E. J., Putliwala, T. & Feschotte, C. Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene* **390**, 3-17 (2007).
60. Gueiros-Filho, F. J. & Beverley, S. M. Trans-kingdom transposition of the *Drosophila* element mariner within the protozoan *Leishmania*. *Science* **276**, 1716-1719 (1997).
61. Cordaux, R., Udit, S., Batzer, M. A. & Feschotte, C. Birth of a chimeric primate gene by capture of the transposase gene from a mobile element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 8101-8106 (2006).
62. Feschotte, C. Merlin, a new superfamily of DNA transposons identified in diverse animal genomes and related to bacterial IS1016 insertion sequences. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 1769-1780 (2004).
63. Feschotte, C. & Pritham, E. J. Non-mammalian c-integrases are encoded by giant transposable elements. *Trends in Genetics* **21**, 551-552 (2005).
64. Pace, J. K., Gilbert, C., Clark, M. S. & Feschotte, C. Repeated horizontal transfer of a DNA transposon in mammals and other tetrapods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17023-17028 (2008).

65. Conley, A. B., Piriyaopongsa, J. & Jordan, I. K. Retroviral promoters in the human genome. *Bioinformatics* **24**, 1563-1567 (2008).
66. Samuelson, L. C., Phillips, R. S. & Swanberg, L. J. Amylase gene structures in primates: retroposon insertions and promoter evolution. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 767-779 (1996).
67. Molloy, S. Coordinated uptake. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 667 (2005).
68. Chelobanov, B. P. *et al.* Interaction of keratin K1 with nucleic acids on the cell surface. *Biochemistry. Biokhimiia* **68**, 1239-1246 (2003).
69. Chelobanov, B. P., Laktionov, P. P., Kharkova, M. B., Rykova, E. Y. & Vlassov, V. V. Isolation of nucleic acid binding proteins: an approach for isolation of cell surface, nucleic acid binding proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1022**, 239-243 (2004).
70. Laktionov, P. *et al.* Cell-surface-bound nucleic acids: free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1022**, 221-227 (2004).
71. Laktionov, P. P. *et al.* Characterisation of membrane oligonucleotide-binding proteins and oligonucleotide uptake in keratinocytes. *Nucleic Acids Research* **27**, 2315-2324 (1999).
72. Yakubov, L. A. *et al.* Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: Involvement of specific receptors? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 6454-6458 (1989).
73. Chelobanov, B. P., Laktionov, P. P. & Vlasov, V. V. Proteins involved in binding and cellular uptake of nucleic acids. *Biochemistry. Biokhimiia* **71**, 583-596 (2006).
74. Yakubov, L. A., Shestova, O. E., Andreeva, A. & Vlasov, V. V. [Participation of specific cell surface proteins in the transport of nucleic acids into cells]. *Doklady Akademii nauk* **361**, 550-553 (1998).
75. Vlasov, V. V., Deeva, E. A., Ivanova, E. M. & Yakubov, L. A. [Possible participation of specific receptors in the transport of nucleic acids in cells]. *Doklady Akademii nauk SSSR* **308**, 998-1000 (1989).
76. Cotten, M., Wagner, E. & Birnstiel, M. L. Receptor-mediated transport of DNA into eukaryotic cells. *Methods in Enzymology* **217**, 618-644 (1993).
77. Bennett, R. M. As nature intended? The uptake of DNA and oligonucleotides by eukaryotic cells. *Antisense Research and Development* **3**, 235-241 (1993).
78. Bennett, R. M., Gabor, G. T. & Merritt, M. M. DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA. *The Journal of Clinical Investigation* **76**, 2182-2190 (1985).
79. Siess, D. C. *et al.* A human gene coding for a membrane-associated nucleic acid-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 33655-33662 (2000).
80. Majumdar, C. & Frankel, F. R. Studies on the binding of the estradiol-receptor complex to rat DNA fragments. *Molecular and Cellular Endocrinology* **11**, 153-168 (1978).
81. Charreau, E. H. & Baldi, A. Binding of estradiol receptor complexes to isolated human breast chromatin. *Molecular and Cellular Biochemistry* **16**, 79-86 (1977).
82. MacLeod, K. M. & Baxter, J. D. Chromatin receptors for thyroid hormones. Interactions of the solubilized proteins with DNA. *The Journal of Biological Chemistry* **251**, 7380-7387 (1976).
83. Burckstummer, T. *et al.* An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nature Immunology* **10**, 266-272 (2009).
84. Yanai, H., Savitsky, D., Tamura, T. & Taniguchi, T. Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. *Current Opinion in Immunology* **21**, 17-22 (2009).
85. Takaoka, A. *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**, 501-505 (2007).
86. Thompson, J. M. & Iwasaki, A. Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 786-794 (2008).

87. Barton, G. M. Viral recognition by Toll-like receptors. *Seminars in Immunology* **19**, 33-40 (2007).
88. Uematsu, S. & Akira, S. [Innate immune recognition of viral infection]. *Virus. Journal of Virology* **56**, 1-8 (2006).
89. Fukui, R. *et al.* Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *The Journal of Experimental Medicine* **206**, 1339-1350 (2009).
90. Miyazato, A. *et al.* Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infection and Immunity* **77**, 3056-3064 (2009).
91. Nakamura, K. *et al.* Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *Journal of Immunology* **180**, 4067-4074 (2008).
92. Abou Fakher, F. H., Rachinel, N., Klimczak, M., Louis, J. & Doyen, N. TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. *Journal of Immunology* **182**, 1386-1396 (2009).
93. Kumagai, Y. & Akira, S. [Role of TLR-dependent and independent pathways in autoimmunity]. *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine* **67**, 487-493 (2009).
94. von Landenberg, P. & Bauer, S. Nucleic acid recognizing Toll-like receptors and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* **19**, 606-610 (2007).
95. Hurst, J. & von Landenberg, P. Toll-like receptors and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* **7**, 204-208 (2008).
96. Chi, H. & Flavell, R. A. Innate recognition of non-self nucleic acids. *Genome Biology* **9**, 211-217 (2008).
97. Lamphier, M. S., Sirois, C. M., Verma, A., Golenbock, D. T. & Latz, E. TLR9 and the recognition of self and non-self nucleic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1082**, 31-43 (2006).
98. Lehmann, M. J. & Sczakiel, G. Spontaneous uptake of biologically active recombinant DNA by mammalian cells via a selected DNA segment. *Gene Therapy* **12**, 446-451 (2004).
99. Stacey, K. J., Sweet, M. J. & Hume, D. A. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *Journal of Immunology* **157**, 2116-2122 (1996).
100. Farzaneh, F. *et al.* ADP-ribosylation is involved in the integration of foreign DNA into the mammalian cell genome. *Nucleic Acids Research* **16**, 11319-11326 (1988).
101. Lee, S. H. *et al.* The SET domain protein Metnase mediates foreign DNA integration and links integration to nonhomologous end-joining repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 18075-18080 (2005).
102. Bagasra, O. & Prilliman, K. RNA interference: The molecular immune system. *Journal of Molecular Histology* **35**, 545-553 (2004).
103. van Rij, R. P. & Berezikov, E. Small RNAs and the control of transposons and viruses in *Drosophila*. *Trends in Microbiology* **17**, 163-171 (2009).
104. Olsen, I. & Harris, G. Uptake and release of DNA by lymphoid tissue and cells. *Immunology* **27**, 973-987 (1974).
105. Halicka, D., Bedner, E. & Darzynkiewicz, Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Experimental Cell Research* **260**, 248-256 (2000).
106. McIntosh, A. A. & Adams, D. H. Further studies on the extrusion of cytosol macromolecules by cultured chick embryo fibroblast cells. *The International Journal of Biochemistry* **17**, 147-153 (1985).
107. Rosi, A., Guidoni, L., Luciani, A. M., Mariutti, G. & Viti, V. RNA-lipid complexes released from the plasma membrane of human colon carcinoma cells. *Cancer Letters* **39**, 153-160 (1988).
108. Stroun, M. *et al.* Presence of RNA in the nucleoprotein complex spontaneously released by human lymphocytes and frog auricles in culture. *Cancer Research* **38**, 3546-3554 (1978).

109. Ng, E. *et al.* Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clinical Chemistry* **48**, 1212-1217 (2002).
110. Nyssen, J., Wang, H. C. & Fedoroff, F. The effect of normal spleen cells on 3H-thymidine uptake by target cells in vitro. *British Journal of Experimental Pathology* **56**, 223-230 (1975).
111. Bell, E. I-DNA: Its packaging into I-somes and its relation to protein synthesis during differentiation. *Nature* **224**, 326-328 (1969).
112. Bell, E., Merrill, C. & Lawrence, C. B. An analysis of DNA-containing particles recovered from the cytoplasm of differentiating chick-muscle cells. *European Journal of Biochemistry* **29**, 444-454 (1972).
113. Bell, E. Informational DNA synthesis distinguished from that of nuclear DNA by inhibitors of DNA synthesis. *Science* **174**, 603-606 (1972).
114. Kuligina, E. V., Vratskih, O. V., Semenov, D. V., Matveeva, V. A. & Richter, V. A. Deamination of adenosines in extracellular RNA spontaneously internalized by human cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1137**, 51-57 (2008).
115. Martin, H. M. *et al.* Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**, 80-93 (2004).
116. Choi, J.-J., Reich III, C. F. & Pisetsky, D. S. Release of DNA from dead and dying lymphocyte and monocyte cell lines *in vitro*. *Scandinavian Journal of Immunology* **60**, 159-166 (2004).
117. Holdenrieder, S. *et al.* Nucleosomes in serum as a marker for cell death. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **39**, 596-605 (2001).
118. Jiang, N., Reich, C. F., III & Pisetsky, D. S. Role of macrophages in the generation of circulating blood nucleosomes from dead and dying cells. *Blood* **102**, 2243-2250 (2003).
119. Distelhorst, C. W., Cramer, K. & Rogers, J. C. Selective release of excreted DNA sequences from phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. Effects of trypsin and divalent cations. *The Journal of Clinical Investigation* **61**, 1204-1217 (1978).
120. Gahan, P. B., Anker, P. & Stroun, M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1137**, 7-17 (2008).
121. Hoessli, D. C., Jones, A. P., Eisenstadt, J. M. & Waksman, B. H. Studies on DNA release by cultured rat lymphoblasts. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **54**, 517-528 (1977).
122. Jachertz, D., Anker, P., Maurice, P. A. & Stroun, M. Information carried by the DNA released by antigen-stimulated lymphocytes. *Immunology* **37**, 753-763 (1979).
123. Rogers, J. C., Boldt, D., Kornfeld, S., Skinner, A. & Valeri, C. R. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 1685-1689 (1972).
124. Rogers, J. C. Characterization of DNA excreted from phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* **143**, 1249-1264 (1976).
125. Rogers, J. C. Identification of an intracellular precursor to DNA excreted by human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, 3211-3215 (1976).
126. Stroun, M. & Anker, P. Nucleic acids spontaneously released by living frog auricles. *The Biochemical Journal* **128**, 100P-101P (1972).
127. Stroun, M., Anker, P., Gahan, P. B. & Henry, J. Spontaneous release of newly synthesized DNA from frog auricles. *Archives des Sciences (Genève)* **30**, 229-241 (1977).
128. Adams, D. H. & Gahan, P. B. The DNA extruded by rat spleen cells in culture. *International Journal of Biochemistry* **15**, 547-552 (1983).
129. Anker, P., Stroun, M. & Maurice, P. A. Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by human blood lymphocytes. *Cancer Research* **36**, 2832-2839 (1976).

130. Anker, P., Stroun, M. & Maurice, P. A. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an *in vitro* system. *Cancer Research* **35**, 2375-2382 (1975).
131. Anker, P., Stroun, M. & Maurice, P. [Characteristics of nucleic acids excreted by non-stimulated normal human lymphocytes]. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* **107**, 1457 (1977).
132. Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D. & Daffonchio, D. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research* **6**, 37-53 (2007).
133. Pietramellara, G. *et al.* Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils* **45**, 219-235 (2009).
134. Poté, J. *et al.* Extracellular plant DNA in Geneva groundwater and traditional artesian drinking water fountains. *Chemosphere* **75**, 498-504 (2009).
135. Corinaldesi, C., Beolchini, F. & Dell'Anno, A. Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: implications for the preservation of gene sequences. *Molecular Ecology* **17**, 3939-3951 (2008).
136. Mandel, P. & Métais, P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *Les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris)* **142**, 241-243 (1948).
137. Martínez-Ezquerro, J. D., Trejo-Becerril, C. & Duenas-González, A. El ADN circulante y su potencial clínico. *Ciencia* **59**, 64-73 (2007).
138. Sanchez-Puerta, M. V., Cho, Y., Mower, J. P., Alverson, A. J. & Palmer, J. D. Frequent, phylogenetically local horizontal transfer of the *cox1* group I intron in flowering plant mitochondria. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1762-1777 (2008).
139. Davis, C. C. & Wurdack, K. J. Host-to-parasite gene transfer in flowering plants: phylogenetic evidence from Malpighiales. *Science* **305**, 676-678 (2004).
140. Sætre, I. W. Detection of horizontal transfer events in eukaryotes using bioinformatics methods, with a focus on incorporated dietary DNA. *Thesis*. University of Oslo, Department of Informatics, 1-93 (2007)
141. Rogachev, V. *et al.* Qualitative and quantitative characteristics of the extracellular DNA delivered to the nucleus of a living cell. *Cancer Cell International* **6**, 23-41 (2006).
142. Rumore, P. & Steinman, C. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *The Journal of Clinical Investigation* **86**, 69-74 (1990).
143. Adams, D. H. & McIntosh, A. A. G. The cytosol origin of macromolecules extruded by chick embryo fibroblasts and its uptake by recipient cultured cells. *The International Journal of Biochemistry* **16**, 721-726 (1984).
144. Adams, D. H. & McIntosh, A. A. Studies on the cytosolic DNA of chick embryo fibroblasts and its uptake by recipient cultured cells. *The International Journal of Biochemistry* **17**, 1041-1051 (1985).
145. Adams, D. H. The problem of cytoplasmic DNA: its extrusion/uptake by cultured cells and its possible role in cell-cell information transfer. *The International Journal of Biochemistry* **17**, 1133-1141 (1985).
146. Adams, D. H. & Challen, C. The chick embryo fibroblast cytosolic DNA complex—a possible cell-cell messenger. *The International Journal of Biochemistry* **20**, 921-928 (1988).
147. Adams, D. H., Diaz, N. & Gahan, P. B. In vitro stimulation by tumour cell media of [3H]-thymidine incorporation by mouse spleen lymphocytes. *Cell Biochemistry and Function* **15**, 119-126 (1997).
148. Vlassov, V. V., Balakireva, L. A. & Yakubov, L. A. Transport of oligonucleotides across natural and model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1197**, 95-108 (1994).
149. Loke, S. L. *et al.* Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 3474-3478 (1989).
150. Holmgren, L. *et al.* Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* **93**, 3956-3963 (1999).

151. de Jonge, A. J. & Bootsma, D. Chromosome and DNA-mediated gene transfer in cultured mammalian cells. *International Review of Cytology* **92**, 132-158 (1984).
152. Basner-Tschakarjan, E., Mirmohammadsadegh, A., Baer, A. & Hengge, U. R. Uptake and trafficking of DNA in keratinocytes: evidence for DNA-binding proteins. *Gene Therapy* **11**, 765-774 (2004).
153. Wittrup, A. *et al.* Identification of proteins released by mammalian cells that mediate DNA internalization through proteoglycan dependent macropinocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 27897-27904 (2007).
154. Wurtele, H., Little, K. C. E. & Chartrand, P. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Therapy* **10**, 1791-1799 (2003).
155. Waldman, B. C. & Waldman, A. S. Illegitimate and homologous recombination in mammalian cells: differential sensitivity to an inhibitor of poly(ADP-ribosylation). *Nucleic Acids Research* **18**, 5981-5988 (1990).
156. Lin, F. L., Sperle, K. & Sternberg, N. Repair of double-stranded DNA breaks by homologous DNA fragments during transfer of DNA into mouse L cells. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 113-119 (1990).
157. Hall, C., Brachat, S. & Dietrich, F. S. Contribution of horizontal gene transfer to the evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **4**, 1102-1115 (2005).
158. Gahan, P. B., Wyndaele, R., Mantell, S. & Boggetti, B. Evidence that direct DNA uptake through cut shoots leads to genetic transformation of *Solanum aviculare* Forst. *Cell Biochemistry and Function* **21**, 11-17 (2003).
159. Gahan, P. B. Messenger DNA in higher plants. *Cell Biochemistry and Function* **21**, 207-209 (2003).
160. Stroun, M., Anker, P., Cattaneo, A. & Rossier, A. Effect of the extent of DNA transcription of plant cells and bacteria on the transcription in plant cells of DNA released from bacteria. *FEBS Letters* **13**, 161-164 (1971).
161. Stroun, M. On the nature of the polymerase responsible for the transcription of released bacterial DNA in plant cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **44**, 571-578 (1971).
162. Stroun, M. & Anker, P. Bacterial RNA synthesis in animal cells following bacterial contact. *FEBS Letters* **16**, 114-116 (1971).
163. Stroun, M. & Anker, P. Transcription of spontaneously released bacterial deoxyribonucleic acid in frog auricles. *Journal of Bacteriology* **114**, 114-120 (1973).
164. Anker, P., Stroun, M. & Laroche, J. Bacterial RNA synthesis in frog auricles after intraperitoneal injection of bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* **28**, 488-489 (1972).
165. Anker, P. & Stroun, M. Bacterial ribonucleic acid in the frog brain after a bacterial peritoneal infection. *Science* **178**, 621-623 (1972).
166. Anker, P. & Stroun, M. Bacterial ribonucleic acid synthesis in frog organs after intraperitoneal injection of bacteria. *The Biochemical Journal* **128**, 101P (1972).
167. Nakayama, T. & Ishida, K. Another acquisition of a primary photosynthetic organelle is underway in *Paulinella chromatophora*. *Current Biology* **19**, R284-R285 (2009).
168. Garcia-Vallve, S., Romeu, A. & Palau, J. Horizontal gene transfer of glycosyl hydrolases of the rumen fungi. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 352-361 (2000).
169. Adams, K. L., Daley, D. O., Qiu, Y. L., Whelan, J. & Palmer, J. D. Repeated, recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants. *Nature* **408**, 354-357 (2000).
170. Stroun, M. Modifications transmitted to the offspring, provoked by heterograft in *Solanum melongena*. *Archives des Sciences (Genève)* **16**, 1-21 (1963).
171. Fedoroff, N. Transposons and genome evolution in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 7002-7007 (2000).

172. Wolf, Y. I., Aravind, L., Grishin, N. V. & Koonin, E. V. Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases - analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Research* **9**, 689-710 (1999).
173. Alsmark, U. C., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P. G., Hirt, R. P. & Embley, T. M. Horizontal gene transfer in eukaryotic parasites: a case study of *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Methods in Molecular Biology* **532**, 489-500 (2009).
174. Dolezal, P., Vanacova, S., Tachezy, J. & Hrdy, I. Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins. *Gene* **329**, 81-92 (2004).
175. Coombs, G. H. *et al.* The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 5249-5256 (2004).
176. Striepen, B. *et al.* Gene transfer in the evolution of parasite nucleotide biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3154-3159 (2004).
177. Deitsch, K. W., Driskill, C. L. & Wellems, T. E. Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Research* **29**, 850-853 (2001).
178. Andersson, J. O. & Roger, A. J. Evolutionary analyses of the small subunit of glutamate synthase: gene order conservation, gene fusions, and prokaryote-to-eukaryote lateral gene transfers. *Eukaryotic Cell* **1**, 304-310 (2002).
179. Nosenko, T. & Bhattacharya, D. Horizontal gene transfer in chromalveolates. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 173-191 (2007).
180. Whitaker, J., McConkey, G. & Westhead, D. The transferome of metabolic genes explored: analysis of the horizontal transfer of enzyme encoding genes in unicellular eukaryotes. *Genome Biology* **10**, R36-R49 (2009).
181. Fitzpatrick, D. A., Logue, M. E. & Butler, G. Evidence of recent interkingdom horizontal gene transfer between bacteria and *Candida parapsilosis*. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 181-196 (2008).
182. Novo, M. *et al.* Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 16333-16338 (2009).
183. Wenzl, P., Wong, L., Kwang-Won, K. & Jefferson, R. A. A functional screen identifies lateral transfer of beta-glucuronidase (*gus*) from bacteria to fungi. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 308-316 (2005).
184. Richards, T. A. *et al.* Evolutionary origins of the eukaryotic shikimate pathway: Gene fusions, horizontal gene transfer, and endosymbiotic replacements. *Eukaryotic Cell* **5**, 1517-1531 (2006).
185. Almeida, F. C., Leszczyniecka, M., Fisher, P. B. & DeSalle, R. Examining ancient inter-domain horizontal gene transfer. *Evolutionary Bioinformatics Online* **4**, 109-119 (2008).
186. Archibald, J. M., Rogers, M. B., Toop, M., Ishida, K. i. & Keeling, P. J. Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the secondary plastid-containing alga *Bigeloviella natans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7678-7683 (2003).
187. Raymond, J. & Blankenship, R. E. Horizontal gene transfer in eukaryotic algal evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7419-7420 (2003).
188. Won, H. & Renner, S. S. Horizontal gene transfer from flowering plants to *Gnetum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10824-10829 (2003).
189. Ehara, M., Watanabe, K. I. & Ohama, T. Distribution of cognates of group II introns detected in mitochondrial *cox1* genes of a diatom and a haptophyte. *Gene* **256**, 157-167 (2000).

190. Nickrent, D., Blarer, A., Qiu, Y. L., Vidal-Russell, R. & Anderson, F. Phylogenetic inference in Rafflesiales: the influence of rate heterogeneity and horizontal gene transfer. *BMC Evolutionary Biology* **4**, 40-57 (2004).
191. Davis, C. C., Anderson, W. R. & Wurdack, K. J. Gene transfer from a parasitic flowering plant to a fern. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* **272**, 2237-2242 (2005).
192. Cusimano, N., Zhang, L. B. & Renner, S. S. Reevaluation of the *cox1* group I intron in Araceae and angiosperms indicates a history dominated by loss rather than horizontal transfer. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 265-276 (2008).
193. Stroun, M. & Anker, P. Prehistory of the notion of circulating nucleic acids in plasma/serum (CNAPS): birth of a hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1075**, 10-20 (2006).
194. Bergthorsson, U., Richardson, A. O., Young, G. J., Goertzen, L. R. & Palmer, J. D. Massive horizontal transfer of mitochondrial genes from diverse land plant donors to the basal angiosperm *Amborella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17747-17752 (2004).
195. Ricard, G. *et al.* Horizontal gene transfer from bacteria to rumen ciliates indicates adaptation to their anaerobic, carbohydrates-rich environment. *BMC Genomics* **7**, 22-35 (2006).
196. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
197. Venter, J. C. *et al.* The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351 (2001).
198. Rumpho, M. E. *et al.* Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene *psbO* to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17867-17871 (2008).
199. Gladyshev, E. A., Meselson, M. & Arkhipova, I. R. Massive horizontal gene transfer in bdelloid rotifers. *Science* **320**, 1210-1213 (2008).
200. Leaver, M. J. A family of Tc1-like transposons from the genomes of fishes and frogs: evidence for horizontal transmission. *Gene* **271**, 203-214 (2001).
201. Gilbert, C., Maxfield, D. G., Goodman, S. M. & Feschotte, C. Parallel germline infiltration of a lentivirus in two malagasy lemurs. *PLoS Genetics* **5**, e1000425 (2009).
202. Opperdoes, F. R. & Michels, P. A. M. Horizontal gene transfer in trypanosomatids. *Trends in Parasitology* **23**, 470-476 (2007).
203. Craig, J. P. *et al.* Analysis of a horizontally transferred pathway involved in vitamin B6 biosynthesis from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 2085-2098 (2008).
204. Kondo, N., Nikoh, N., Ijichi, N., Shimada, M. & Fukatsu, T. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14280-14285 (2002).
205. Nikoh, N. & Nakabachi, A. Aphids acquired symbiotic genes via lateral gene transfer. *BMC Biology* **7**, 12-25 (2009).
206. Fenn, K. *et al.* Phylogenetic relationships of the *Wolbachia* of nematodes and arthropods. *PLoS Pathogens* **2**, e94 (2006).
207. Klasson, L., Kambris, Z., Cook, P., Walker, T. & Sinkins, S. Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* **10**, 33-42 (2009).
208. Woolfit, M., Iturbe-Ormaetxe, I., McGraw, E. A. & O'Neill, S. L. An ancient horizontal gene transfer between mosquito and the endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipientis*. *Molecular Biology and Evolution* **26**, 367-374 (2009).
209. Werren, J. H. & Windsor, D. M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* **267**, 1277-1285 (2000).
210. Pichon, S. *et al.* Conservation of the type IV secretion system throughout *Wolbachia* evolution. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **385**, 557-562 (2009).

211. Rances, E., Voronin, D., Tran-Van, V. & Mavingui, P. Genetic and functional characterization of the type IV secretion system in *Wolbachia*. *Journal of Bacteriology* **190**, 5020-5030 (2008).
212. Ohashi, N., Zhi, N., Lin, Q. & Rikihisa, Y. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. *Infection and Immunity* **70**, 2128-2138 (2002).
213. Ros, V. & Hurst, G. Lateral gene transfer between prokaryotes and multicellular eukaryotes: ongoing and significant? *BMC Biology* **7**, 20-23 (2009).
214. Tan, E., Schur, P., Carr, R. & Kunkel, H. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation* **45**, 1732-1740 (1966).
215. Barada, F. Jr. *et al.* Free plasma DNA in patients with pulmonary embolism. *The Southern Medical Journal* **73**, 345-346 (1980).
216. Barnett, E. Detection of nuclear antigens (DNA) in normal and pathologic human fluids by quantitative complement fixation. *Arthritis and Rheumatism* **11**, 407-417 (1968).
217. Breitwieser, W. R. *et al.* Plasma DNA in the diagnosis of pulmonary embolism. *Thorax* **38**, 209-211 (1983).
218. Bret, L., Lule, J., Pourrat, J. & Fournie, G. Extracellular DNA in blood and urine as a potential marker for cytotoxicity and nephrotoxicity in the mouse. *Renal Failure* **12**, 133-139 (1990).
219. Chan, M. *et al.* Quantitative analysis of pleural fluid cell-free DNA as a tool for the classification of pleural effusions. *Clinical Chemistry* **49**, 740-745 (2003).
220. Chang, C. *et al.* Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinical Chimica Acta* **327**, 95-101 (2003).
221. Cox, R. & Gokcen, M. Circulating DNA levels in man. *Biochemical Medicine* **15**, 126-137 (1976).
222. Davis, G. L. Jr. & Davis, J. S. 4th. Detection of circulating DNA by counterimmunoelectrophoresis (CIE). *Arthritis and Rheumatism* **16**, 52-58 (1973).
223. Fournie, G. J. Circulating DNA and lupus nephritis. *Kidney International* **33**, 487-497 (1988).
224. Hughes, G., Cohen, S., Lightfoot, R., Meltzer, J. & Christian, C. The release of DNA into serum and synovial fluid. *Arthritis and Rheumatism* **14**, 259-266 (1971).
225. Kamm, R. & Smith, A. Plasma deoxyribonucleic acid concentrations of women in labor and umbilical cords. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **121**, 29-31 (1975).
226. Kamm, R. C. & Smith, A. G. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clinical Chemistry* **18**, 519-522 (1972).
227. Koffler, D., Agnello, V., Winchester, R. & Kunkel, H. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *The Journal of Clinical Investigation* **52**, 198-204 (1973).
228. Leon, S. A., Ehrlich, G., Shapiro, B. & Labbate, V. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *The Journal of Rheumatology* **4**, 139-143 (1977).
229. Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. & Yaros, M. J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Research* **37**, 646-650 (1977).
230. Lo, Y. M. D. *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* **350**, 485-487 (1977).
231. Lo, Y. M. D. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* **2**, 1363-1365 (1989).
232. Lo, Y. M. D. *et al.* Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Lancet* **351**, 1329-1330 (1998).
233. Lo, Y. M. D., Rainer, T., Chan, L., Hjelm, M. & Cocks, R. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clinical Chemistry* **46**, 319-323 (2000).

234. Lui, Y. *et al.* Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clinical Chemistry* **49**, 495-496 (2003).
235. Lui, Y. Y. *et al.* Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clinical Chemistry* **48**, 421-427 (2002).
236. Rainer, T. *et al.* Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clinical Chemistry* **49**, 562-569 (2003).
237. Raptis, L. & Menard, H. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation* **66**, 1391-1399 (1980).
238. Rochmis, P. G., Palefsky, H., Becker, M., Roth, H. & Zvaifler, N. J. Native DNA binding in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Disease* **33**, 357-360 (1974).
239. Shapiro, B., Chakrabarty, M., Cohn, E. & Leon, S. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* **51**, 2116-2120 (1983).
240. Smid, M. *et al.* Fetal DNA in maternal plasma in twin pregnancies. *Clinical Chemistry* **49**, 1526-1528 (2003).
241. Steinman, C. R. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *The Journal of Clinical Investigation* **56**, 512-515 (1975).
242. Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C. & Maurice, P. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology* **23**, 707-712 (1987).
243. Tamkovich, S. *et al.* Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors. *Clinical Chemistry* **51**, 1317-1319 (2005).
244. Vargo, J. S., Becker, D. M., Philbrick, J. T., Schoonover, F. W. & Davis, J. S. Plasma DNA. A simple, rapid test for aiding the diagnosis of pulmonary embolism. *Chest* **97**, 63-68 (1990).
245. Holdenrieder, S., Mueller, S. & Stieber, P. Stability of nucleosomal DNA fragments in serum. *Clinical Chemistry* **51**, 1026-1029 (2005).
246. Lerner, R. A., Meinke, W. & Goldstein, D. A. Membrane-associated DNA in the cytoplasm of diploid human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 1212-1216 (1971).
247. Stroun, M. & Anker, P. *In vitro* synthesis of DNA spontaneously released by bacteria or frog auricles. *Biochimie* **54**, 1443-1452 (1972).
248. Stroun, M. *et al.* The origin and mechanism of circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* **906**, 161-168 (2000).
249. Lui, Y. Y. N. *et al.* Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clinical Chemistry* **48**, 421-427 (2002).
250. Sozzi, G. *et al.* Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* **21**, 3902-3908 (2003).
251. Chan, K. *et al.* Molecular characterization of circulating EBV-DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients. *Cancer Research* **63**, 2028-2032 (2003).
252. Doerfler, W. *et al.* Foreign DNA integration-perturbations of the genome-oncogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **945**, 276-288 (2001).
253. Duggan, P. S., Chambers, P. A., Heritage, J. & Forbes, J. M. Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiology Letters* **191**, 71-77 (2000).
254. Duggan, P. S., Chambers, P. A., Heritage, J. & Forbes, J. M. Fate of genetically modified maize DNA in the oral cavity and rumen of sheep. *The British Journal of Nutrition* **89**, 159-166 (2003).
255. Chowdhury, E. H. *et al.* Fate of maize intrinsic and recombinant genes in calves fed genetically modified maize Bt11. *Journal of Food Protection* **67**, 365-370 (2004).

256. Chowdhury, E. H. *et al.* Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *Journal of Animal Science* **81**, 2546-2551 (2003).
257. Rossi, F. *et al.* Effect of Bt corn on broiler growth performance and fate of feed-derived DNA in the digestive tract. *Poultry Science* **84**, 1022-1030 (2005).
258. Mercer, D. K., Scott, K. P., Bruce-Johnson, W. A., Glover, L. A. & Flint, H. J. Fate of free DNA and transformation of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* DL1 by plasmid DNA in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 6-10 (1999).
259. Kharazmi, M., Sczesny, S., Blaut, M., Hammes, W. P. & Hertel, C. Marker rescue studies of the transfer of recombinant DNA to *Streptococcus gordonii in vitro*, in foods and gnotobiotic rats. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 6121-6127 (2003).
260. Lu, S. J. *et al.* Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* **112**, 4475-4484 (2008).
261. Ji, P., Jayapal, S. R. & Lodish, H. F. Enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts requires Rac GTPases and mDia2. *Nature Cell Biology* **10**, 314-321 (2008).
262. Jahr, S. *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research* **61**, 1659-1665 (2001).
263. Cherepanova, A. V., Tamkovich, S. N., Bryzgunova, O. E., Vlassov, V. V. & Laktionov, P. P. Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of patients with prostate tumors. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1137**, 218-221 (2008).
264. Tamkovich, S. *et al.* Deoxyribonuclease activity in biological fluids of healthy donors and cancer patients. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **146**, 89-91 (2008).
265. Taper, H. S. Altered deoxyribonuclease activity in cancer cells and its role in non toxic adjuvant cancer therapy with mixed vitamins C and K3. *Anticancer Research* **28**, 2727-2732 (2008).
266. Bijl, M., Reefman, E., Horst, G., Limburg, P. C. & Kallenberg, C. G. M. Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: correlates with decreased serum levels of complement. *Annals of the Rheumatic Disease* **65**, 57-63 (2006).
267. Huss, R., Haas, C., Herrmann, M., Kalden, J. R. & Löhrens, U. Impairment of genomic DNA binding to a putative dysfunctional receptor on erythrocytes independent of complement and antibodies in systemic lupus erythematosus. *Virchows Archiv* **437**, 380-387 (2000).
268. Bergsmedh, A. *et al.* Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6407-6411 (2001).
269. Schaffner, W. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 2163-2167 (1980).
270. Gahan, P. B. Circulating DNA. Intracellular and intraorgan messenger? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1075**, 21-33 (2006).
271. Yakubov, L. A. *et al.* The role of extracellular DNA in the stability and variability of cell genomes. *Doklady. Biochemistry and Biophysics* **382**, 31-34 (2002).
272. Yakubov, L. A. *et al.* Natural human gene correction by small extracellular genomic DNA fragments. *Cell Cycle* **6**, 2293-2301 (2007).
273. Willett-Brozick, J., Savul, S., Richey, L. & Baysal, B. Germ line insertion of mtDNA at the breakpoint junction of a reciprocal constitutional translocation. *Human Genetics* **109**, 216-223 (2001).
274. Bendich, A., Wilczok, T. & Borenfreund, E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science* **148**, 374-376 (1965).
275. Anker, P. *et al.* Transfection of DNA from bacteria to human cells in culture: a possible role in oncogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1022**, 195-201 (2004).

276. Krontiris, T. G. & Cooper, G. M. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 1181-1184 (1981).
277. García-Olmo, D., García-Olmo, D. C., Ontañón, J., Martínez, E. & Vallejo, M. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis. *Histology and Histopathology* **14**, 1159-1164 (1999).
278. García-Olmo, D. & García-Olmo, D. C. Functionality of circulating DNA. The hypothesis of genomestasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **945**, 265-275 (2001).
279. Abken, H., Bützler, C. & Willecke, K. Altered expression of proto-oncogenes in human lymphoid cells immortalized by transfection with extrachromosomal DNA of mouse L cells. *Anticancer Research* **10**, 73-80 (1990).
280. Abken, H., Bützler, C. & Willecke, K. Immortalization of human lymphocytes by transfection with DNA from mouse L929 cytoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 468-472 (1988).
281. Shih, C., Shilo, B. Z., Goldfarb, M. P., Dannenberg, A. & Weinberg, R. A. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 5714-5718 (1979).
282. Bernstein, S. C. & Weinberg, R. A. Expression of the metastatic phenotype in cells transfected with human metastatic tumor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 1726-1730 (1985).
283. Milo, G. E. *et al.* Malignant conversion of chemically transformed normal human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5229-5234 (1996).
284. Hopkins, N., Besmer, P., DeLeo, A. B. & Law, L. W. High-frequency cotransfer of the transformed phenotype and a tumor-specific transplantation antigen by DNA from the 3-methylcholanthrene-induced Meth A sarcoma of BALB/c mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 7555-7559 (1981).
285. Smith, B. L., Anisowicz, A., Chodosh, L. A. & Sager, R. DNA transfer of focus- and tumor-forming ability into nontumorigenic CHEF cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 1964-1968 (1982).
286. Pulciani, S., Santos, E., Lauver, A. V., Long, L. K. & Barbacid, M. Transforming genes in human tumors. *Journal of Cellular Biochemistry* **20**, 51-61 (1982).
287. Shih, C., Padhy, L. C., Murray, M. & Weinberg, R. A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* **290**, 261-264 (1981).
288. Abken, H., Hegger, R., Bützler, C. & Willecke, K. Short DNA sequences from the cytoplasm of mouse tumor cells induce immortalization of human lymphocytes *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6518-6522 (1993).
289. Zajac, V., _tevrková, V., Mátelová, L. & Ujházy, E. Detection of HIV-1 sequences in intestinal bacteria of HIV/AIDS patients. *Neuro Endocrinology Letters* **28**, 591-595 (2007).
290. Spetz, A. L., Patterson, B. K., Lore, K., Andersson, J. & Holmgren, L. Functional gene transfer of HIV DNA by an HIV receptor-independent mechanism. *Journal of Immunology* **163**, 736-742 (1999).
291. Dell'Anno, A. & Corinaldesi, C. Degradation and turnover of extracellular DNA in marine sediments: ecological and methodological considerations. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 4384-4386 (2004).
292. Dell'Anno, A. & Danovaro, R. Extracellular DNA plays a key role in deep-sea ecosystem functioning. *Science* **309**, 2179 (2005).
293. Paul, J. H., Jeffrey, W. H. & DeFlaun, M. F. Dynamics of extracellular DNA in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 170-179 (1987).

294. Borin, S. *et al.* DNA is preserved and maintains transforming potential after contact with brines of the deep anoxic hypersaline lakes of the Eastern Mediterranean Sea. *Saline Systems* **4**, 10-19 (2008).
295. Haile, J. *et al.* Ancient DNA chronology within sediment deposits: are paleobiological reconstructions possible and is DNA leaching a factor? *Molecular Biology and Evolution* **24**, 982-989 (2007).
296. Willerslev, E. *et al.* Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* **300**, 791-795 (2003).
297. Jonas, D. A. *et al.* Safety considerations of DNA in food. *Annals of Nutrition and Metabolism* **45**, 235-254 (2001).
298. Brechot, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B. & Tiollais, P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* **286**, 533-535 (1980).
299. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* **2**, 342-350 (2002).
300. Luo, W. J. *et al.* Epstein-Barr virus is integrated between REL and BCL-11A in American Burkitt lymphoma cell line (NAB-2). *Laboratory Investigation* **84**, 1193-1199 (2004).
301. Hegger, R. & Abken, H. The short DNA sequences in the cytoplasm of Ehrlich ascites tumor cells are tightly associated with proteins. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR* **27**, 321-328 (1995).
302. Murgia, C., Pritchard, J. K., Kim, S. Y., Fassati, A. & Weiss, R. A. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell* **126**, 477-487 (2006).
303. Dingli, D. & Nowak, M. A. Cancer biology: infectious tumour cells. *Nature* **443**, 35-36 (2006).
304. Meléndez-Zajgla, J. & Maldonado, V. [Is cancer a transmittable disease?]. *Gaceta Médica de México* **143**, 353-354 (2007).
305. Pearse, A. M. & Swift, K. Allograft theory: transmission of devil facial-tumour disease. *Nature* **439**, 549 (2006).
306. Cohen, D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. *Advances in Cancer Research* **43**, 75-112 (1985).
307. Margulis, L. & Sagan, D. *Acquiring genomes: a theory of the origins of species*. Basic Books, New York (2002).
308. Anker, P. *et al.* The role of extracellular DNA in the transfer of information from T to B human lymphocytes in the course of an immune response. *Journal of Immunogenetics* **7**, 475-481 (1980).
309. Anker, P., Stroun, M., Jachertz, D. & Maurice, P. A. [Transfer of information from T and B lymphocytes during immune response: role of extracellular DNA]. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* **110**, 1444-1446 (1980).
310. Anker, P., Jachertz, D., Maurice, P. A. & Stroun, M. Nude mice injected with DNA released by antigen stimulated human T lymphocytes produce specific antibodies expressing human characteristics. *Cell Biochemistry and Function* **2**, 33-37 (1984).
311. Anker, P. & Stroun, M. Immunological aspects of circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1075**, 34-39 (2006).