

Acceso abiertoArtículo

Transcripción inversa intracelular de la vacuna de ARNm de Pfizer BioNTech COVID-19 BNT162b2 in vitro en línea celular de hígado humano

por



Markus Aldén



1



Francisko Olofsson Falla

1



daowei yang

1



Mohammad Barghouth

1,



Chen Luan

1,



Magnus Rasmussen

2y



Yang de Marinis



1,*

1

Departamento de Ciencias Clínicas, Universidad de Lund, 20502 Malmö, Suecia

2

Medicina de Infecciones, Departamento de Ciencias Clínicas, Universidad de Lund,
22362 Lund, Suecia

*

Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

Editor académico: Stephen Malnick

actual Cuestiones Mol. Biol. **2022**, *44* (3), 1115-
1126; <https://doi.org/10.3390/cimb44030073>

**Recibido: 18 enero 2022 / Revisado: 19 febrero 2022 / Aceptado: 23 de febrero de
2022 / Publicado: 25 febrero 2022**

(Este artículo pertenece al Tema [Investigación Clínica, Traslacional y Básica de
Enfermedades Hepáticas](#))



Exportación de citas

Resumen

Los estudios preclínicos de la vacuna de ARNm de COVID-19 BNT162b2, desarrollada por Pfizer y BioNTech, mostraron efectos hepáticos reversibles en animales que recibieron la inyección de BNT162b2. Además, un estudio reciente mostró que el ARN del SARS-CoV-2 puede transcribirse de forma inversa e integrarse en el genoma de las células humanas. En este estudio, investigamos el efecto de BNT162b2 en la línea celular de hígado humano Huh7 in vitro. Las células Huh7 se expusieron a BNT162b2 y se realizó una PCR cuantitativa en el ARN extraído de las células. Detectamos altos niveles de BNT162b2 en células Huh7 y cambios en la expresión génica del elemento nuclear 1 intercalado largo (LINE-1), que es una transcriptasa inversa endógena. La inmunohistoquímica que utiliza la unión de anticuerpos a la proteína de unión al ARN del marco de lectura abierto 1 de LINE-1 (ORFp1) en células Huh7 tratadas con BNT162b2 indicó una mayor distribución del núcleo de LINE-1. La PCR en ADN genómico de células Huh7 expuestas a BNT162b2 amplificó la secuencia de ADN exclusiva de BNT162b2. Nuestros resultados indican una captación rápida de BNT162b2 en la línea celular de hígado humano Huh7, lo que lleva a cambios en la expresión y distribución de LINE-1. También mostramos que el ARNm de BNT162b2 se transcribe de forma inversa intracelularmente en ADN en tan solo 6 h tras la exposición a BNT162b2.

Palabras clave: vacuna de ARNm de COVID-19 ; BNT162b2 ; hígado ; transcripción inversa ; LÍNEA-1 ; Huh7

1. Introducción

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) causada por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) fue anunciada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una pandemia mundial el 11 de marzo de 2020, y surgió como una crisis de salud devastadora. Hasta febrero de 2022, COVID-19 ha provocado más de 430 millones de casos de infección informados y 5,9 millones de muertes en todo el mundo [1]. Se necesitan con urgencia vacunas eficaces y seguras para reducir las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas con la COVID-19.

Se han desarrollado varias vacunas para COVID-19, con un enfoque particular en vacunas de ARNm (por Pfizer-BioNTech y Moderna), vacunas de vectores adenovirales recombinantes de replicación defectuosa (por Janssen-Johnson y Johnson, Astra-Zeneca, Sputnik-V y CanSino) y vacunas inactivadas (de Sinopharm, Bharat Biotech y Sinovac). La vacuna de ARNm tiene las ventajas de ser flexible y eficiente en el diseño y la fabricación de inmunógenos y, en la actualidad, numerosas vacunas candidatas se encuentran en diversas etapas de desarrollo y aplicación. Específicamente, la vacuna de ARNm de COVID-19 BNT162b2 desarrollada por Pfizer y BioNTech ha sido evaluada en ensayos clínicos exitosos [2, 3, 4] y administrada en campañas nacionales de vacunación de COVID-19 en diferentes regiones del mundo [5, 6, 7, 8].

BNT162b2 es una vacuna de ARN modificado con nucleósidos (ARNmod) encapsulada en nanopartículas lipídicas (LNP) y codifica la proteína de punta (S) del SARS-CoV-2 de longitud completa, modificada por dos mutaciones de prolina para

garantizar una conformación previa a la fusión antigénicamente óptima, que imita al virus intacto para provocar anticuerpos neutralizantes de virus [[3](#)]. De acuerdo con los ensayos clínicos aleatorios, BNT162b2 mostró una alta eficiencia en una amplia gama de resultados relacionados con COVID-19 en un entorno del mundo real [[5](#)]. Sin embargo, quedan muchos desafíos, incluido el monitoreo de la seguridad y eficacia a largo plazo de la vacuna. Esto justifica más evaluaciones e investigaciones. El perfil de seguridad de BNT162b2 actualmente solo está disponible a partir de estudios clínicos a corto plazo. Se han informado efectos adversos menos comunes de BNT162b2, que incluyen pericarditis, arritmia, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio, hemorragia intracraneal y trombocitopenia [[4](#) , [9](#) , [10](#) , [11](#) , [12](#) , [13](#) , [14](#) , [15](#) , [16](#) , [17](#) , [18](#) , [19](#) , [20](#)]. También hay estudios que reportan efectos adversos observados en otros tipos de vacunas [[21](#) , [22](#) , [23](#) , [24](#)]. Para comprender mejor los mecanismos subyacentes a los efectos adversos relacionados con las vacunas, se necesitan investigaciones clínicas y análisis celulares y moleculares.

Un estudio reciente mostró que los ARN del SARS-CoV-2 pueden transcribirse de forma inversa e integrarse en el genoma de las células humanas [[25](#)]. Esto da lugar a la pregunta de si esto también puede ocurrir con BNT162b2, que codifica el ARN parcial del SARS-CoV-2. En los datos farmacocinéticos proporcionados por Pfizer a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), se estudió la biodistribución de BNT162b2 en ratones y ratas mediante inyección intramuscular con LNP radiomarcado y modRNA de luciferasa. La radiactividad se detectó en la mayoría de los tejidos desde el primer momento (0,25 h), y los resultados mostraron que el sitio de inyección y el hígado fueron los principales sitios de distribución, con concentraciones máximas observadas entre 8 y 48 h después de la dosis [[26](#)]. Además, en los animales que recibieron la inyección de BNT162b2, se observaron efectos hepáticos reversibles, como agrandamiento del hígado, vacuolización, aumento de los niveles de gamma glutamil transferasa (γ GT) y aumento de los niveles de aspartato transaminasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP) [[26](#)]. Los efectos hepáticos transitorios inducidos por los sistemas de administración de LNP se han informado previamente [[27](#) , [28](#) , [29](#) , [30](#)], sin embargo, también se ha demostrado que el LNP vacío sin modRNA solo no introduce ninguna lesión hepática significativa [[27](#)]. Por lo tanto, en este estudio, nuestro objetivo es examinar el efecto de BNT162b2 en una línea celular de hígado humano in vitro e investigar si BNT162b2 se puede transcribir de forma inversa en ADN a través de mecanismos endógenos.

2. Materiales y métodos

2.1. Cultivo de células

Se cultivaron células Huh7 (JCRB Cell Bank, Osaka, Japón) a 37 °C a 5 % de CO₂ con medio DMEM (HyClone, HYCLSH30243.01) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v) (Sigma-Aldrich, F7524). -500ML, Burlington, MA, EE. UU.) y 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina (HyClone, SV30010, Logan, UT, EE. UU.). Para el tratamiento con BNT162b2, se sembraron células Huh7 con una densidad de 200 000 células/pocillo en placas de 24 pocillos. La vacuna de ARNm BNT162b2 (Pfizer BioNTech, Nueva York, NY, EE. UU.) se diluyó con una inyección estéril de cloruro de sodio al 0,9 %, USP, en una concentración final de 100 μ g/mL, como se describe en la guía del fabricante [[31](#)]. A continuación, se añadió la suspensión de BNT162b2 en medios de cultivo celular para alcanzar concentraciones finales de 0,5, 1,0 o 2,0 μ g/ml. Las células Huh7 se incubaron con o sin BNT162b2 durante 6, 24 y 48 h. Las células se lavaron a fondo con PBS y se recolectaron por tripsinización y se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

2.2. RT-QPCR EN TIEMPO REAL

El ARN de las células se extrajo con RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, 74134, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. La RT-PCR se realizó con el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, K1622, Waltham, MA, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. La qPCR en tiempo real se realizó utilizando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, K0222, Waltham, MA, EE. UU.) con cebadores para BNT162b2, *LINE-1* y genes de limpieza *ACTB* y *GAPDH* (**Tabla 1**).

Tabla 1. Secuencias de cebadores de RT-qPCR y PCR.

Tabla 1. Secuencias de cebadores de RT-qPCR y PCR.			

2.3. Tinción de inmunofluorescencia e imágenes confocales

Las células Huh7 se cultivaron en portaobjetos de ocho cámaras (LAB-TEK, 154534, Santa Cruz, CA, EE. UU.) con una densidad de 40 000 células/pocillo, con o sin BNT162b2 (0,5, 1 o 2 $\mu\text{g/mL}$) durante 6 h. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpo primario anti-LINE-1 ORF1p monoclonal de ratón (Merck, 3574308, Kenilworth, NJ, EE. UU.), anticuerpo secundario Cy3 Donkey anti-ratón (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.) y Hoechst (Life technologies, 34850, Carlsbad, CA, EE. UU.), siguiendo el protocolo de Thermo Fisher (Waltham, MA, EE. UU.). Se tomaron dos imágenes por condición utilizando un Zeiss LSM 800 y un objetivo de inmersión en aceite 63X, y la intensidad de la tinción se cuantificó en el área de la célula completa individual y el área del núcleo en 15 células por imagen mediante ImageJ 1.53c. La intensidad de tinción de LINE-1 para el citosol se calculó restando la intensidad del núcleo de la de toda la célula. A todas las imágenes de las celdas se les asignó un número aleatorio para evitar sesgos. Para marcar los núcleos (determinados por la tinción de Hoechst) y las células enteras (determinados por los bordes de la fluorescencia LINE-1), se utilizó la herramienta de selección Freehand. Luego se midieron estas áreas y se usó la intensidad media para comparar los grupos.

2.4. Purificación de ADN genómico, amplificación por PCR, purificación en gel de agarosa y secuenciación de Sanger

El ADN genómico se extrajo de sedimentos celulares con tampón PBNB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, NP-40 al 0,45 %, Tween-20 al 0,45 %) de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente [32]. Para eliminar el ARN residual de la preparación de ADN, se añadió RNasa (100 $\mu\text{g/mL}$, Qiagen, Hilden, Alemania) a la preparación de ADN y se incubó a 37 °C durante 3 h, seguido de 5 min a 95 °C. A continuación, se realizó la PCR utilizando cebadores dirigidos a BNT162b2 (las secuencias se muestran en **la Tabla 1**), con el siguiente programa: 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 minuto; finalmente, 72 °C por 5 min y 12 °C por 5 min. Los productos de PCR se corrieron al 1,4% (*p/v*) Gel de agarosa. Se cortaron las bandas correspondientes a los amplicones del tamaño esperado (444 pb) y se extrajo el ADN utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, 28104, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia del amplicón de ADN se verificó mediante secuenciación de Sanger (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania).

Estadísticas

Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando la prueba *t* de Student de dos colas y ANOVA. Los datos se expresan como la media \pm SEM o \pm SD. Las diferencias con *p* < 0,05 se consideran significativas.

2.5. Declaraciones éticas

La línea celular Huh7 se obtuvo del banco de células de la Colección japonesa de recursos biológicos de investigación (JCRB).

3. Resultados

3.1. BNT162b2 ingresa a la línea celular de hígado humano Huh7 Cells con alta eficiencia

Para determinar si BNT162b2 ingresa a las células hepáticas humanas, expusimos la línea de células hepáticas humanas Huh7 a BNT162b2. En un estudio previo sobre la cinética de captación de LNP en células Huh7, se observó la máxima eficacia biológica de LNP entre 4 y 7 h [33]. Por lo tanto, en nuestro estudio, las células Huh7 se cultivaron con o sin concentraciones crecientes de BNT162b2 (0,5, 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/mL}$) durante 6, 24 y 48 h. Se extrajo el ARN de las células y se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando cebadores dirigidos a la secuencia BNT162b2, como se ilustra en la **Figura 1** . La secuencia completa de BNT162b2 está disponible públicamente [34] y contiene una tapa de dos nucleótidos; 5'-región no traducida (UTR) que incorpora la 5'-UTR de un gen de α -globina humana; la proteína SARS-CoV-2 S de longitud completa con dos mutaciones de prolina; 3'-UTR que incorpora el segmento 12S rRNA (mtRNR1) mitocondrial humano y el segmento del gen AES/TLE5 humano con dos mutaciones C→U; cola de poli(A). El análisis detallado de la secuencia de la proteína S en BNT162b2 reveló 124 secuencias que son 100 % idénticas a las secuencias genómicas humanas y tres secuencias con solo un desajuste de nucleótido (nt) en 19–26 nts (**Tabla S1, consulte Materiales complementarios**). Para detectar el nivel de ARN de BNT162b2, diseñamos cebadores con cebador directo ubicado en las regiones de la proteína S del SARS-CoV-2 y cebador inverso en 3'-UTR, lo que permite la detección del amplicón de PCR exclusivo de BNT162b2 sin unión inespecífica de los cebadores a las regiones genómicas humanas .

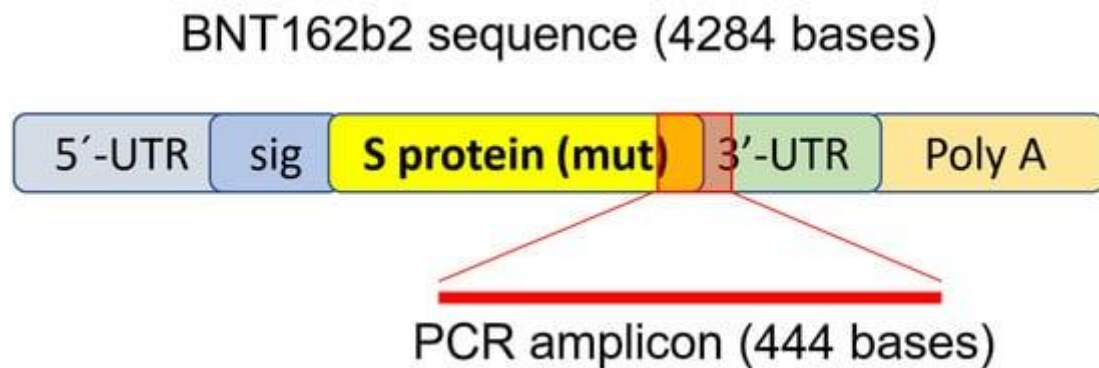


Figura 1. Conjunto de cebadores de PCR utilizados para detectar el nivel de ARNm y la transcripción inversa de BNT162b2. La ilustración de BNT162b2 se adaptó de la literatura descrita anteriormente [34].

Los resultados de RT-qPCR mostraron que las células Huh7 tratadas con BNT162b2 tenían niveles altos de ARNm de BNT162b2 en relación con los genes de limpieza a las 6, 24 y 48 h (**Figura 2** , presentada en $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ registrado debido a niveles excepcionalmente altos). Las tres concentraciones de BNT162b2 condujeron a niveles similares de ARNm de BNT162b2 intracelular en los diferentes puntos de tiempo, excepto que la diferencia significativa entre 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/mL}$ se observó a las 48 h. Los niveles de ARNm de BNT162b2 disminuyeron significativamente a las 24 h en comparación con las 6 h, pero aumentaron nuevamente a las 48 h.

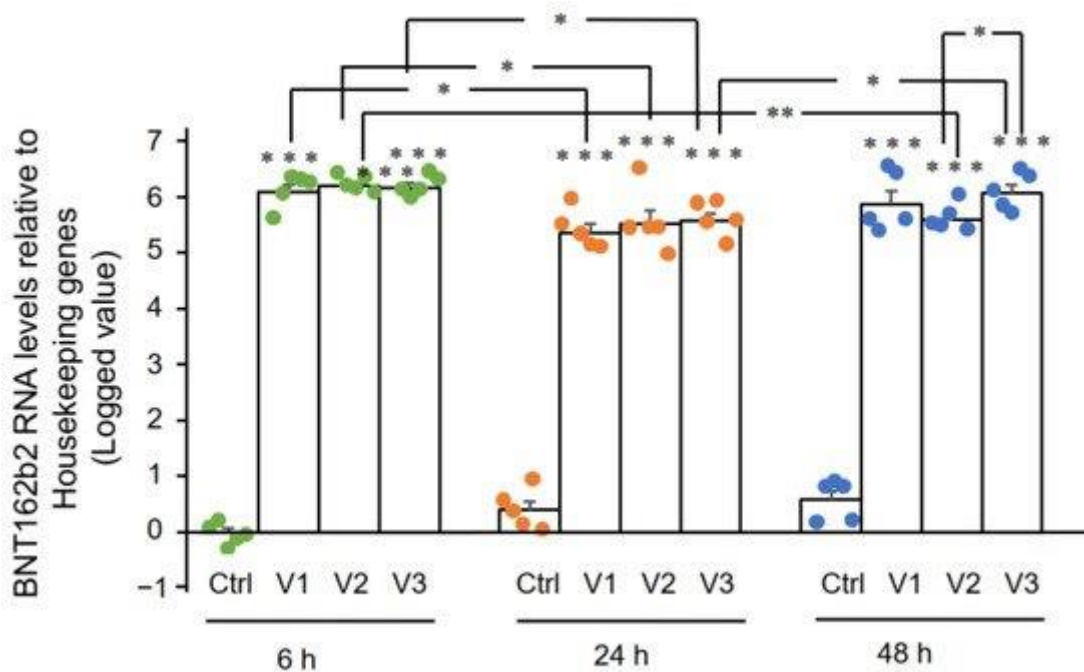


Figura 2. Niveles de ARNm de BNT162b2 en células Huh7 tratadas con BNT162b2. Las células Huh7 se trataron sin (Ctrl) o con 0,5 (V1), 1 (V2) y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (V3) de BNT162b2 durante 6 (puntos verdes), 24 (puntos naranjas) y 48 h (puntos azules). El ARN se purificó y se realizó qPCR utilizando cebadores dirigidos a BNT162b2. Los niveles de ARN de BNT162b2 se presentan como valores registrados de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ en relación con los genes domésticos *GAPDH* y *ACTB*. Los resultados son de cinco experimentos independientes ($n = 5$). Las diferencias entre los grupos respectivos se analizaron utilizando la prueba *t* de Student de dos colas. Los datos se expresan como la media \pm SEM. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente al control respectivo en cada punto de tiempo, o según se indique).

3.2. Efecto de BNT162b2 en el elemento nuclear 1 intercalado largo de transcriptasa inversa endógena humana (*LINE-1*)

Aquí examinamos el efecto de BNT162b2 en la expresión del gen *LINE-1*. La RT-qPCR se realizó en ARN purificado de células Huh7 tratadas con BNT162b2 (0, 0,5, 1,0 y 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 6, 24 y 48 h, utilizando cebadores dirigidos a *LINE-1*. Se observó un aumento significativo de la expresión de *LINE-1* en comparación con el control a las 6 h con 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BNT162b2, mientras que concentraciones más bajas de BNT162b2 redujeron la expresión de *LINE-1* en todos los puntos temporales ([Figura 3](#)).

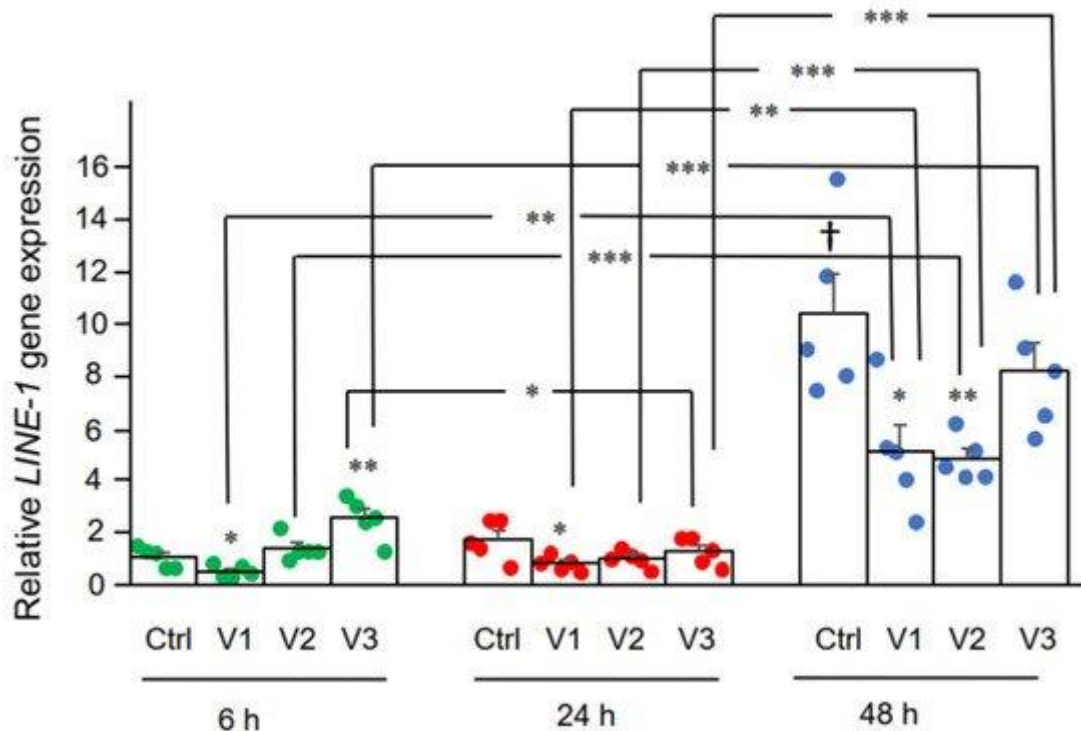


Figura 3. Niveles de ARNm de *LINE-1* en células Huh7 tratadas con BNT162b2. Las células Huh7 se trataron sin (Ctrl) o con 0,5 (V1), 1 (V2) y 2 $\mu\text{g/mL}$ (V3) de BNT162b2 durante 6 (puntos verdes), 24 (puntos rojos) y 48 h (puntos azules). El ARN se purificó y se realizó qPCR utilizando cebadores dirigidos a *LINE-1*. Los niveles de ARN de *LINE-1* se presentan como valores de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ en relación con los genes domésticos *GAPDH* y *ACTB*. Los resultados son de cinco experimentos independientes ($n = 5$). Las diferencias entre los grupos respectivos se analizaron utilizando la prueba *t* de Student de dos colas. Los datos se expresan como la media \pm SEM. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente al control respectivo en cada punto de tiempo, o según se indique; † $p < 0,05$ frente a 6 h-Ctrl).

A continuación, estudiamos el efecto de BNT162b2 en el nivel de proteína LINE-1. El LINE-1 de longitud completa consta de una región no traducida (UTR) de 5', dos marcos de lectura abiertos (ORF), ORF1 y ORF2, y un 3'UTR, del cual ORF1 es una proteína de unión a ARN con actividad chaperona. Se ha demostrado que la actividad de retrotransposición de LINE-1 implica la translocación de ORF1 al núcleo [35]. Las células Huh7 tratadas con o sin BNT162b2 (0,5, 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/mL}$) durante 6 h se fijaron y tiñeron con anticuerpos que se unen a LINE-1 ORF1p y la sonda Hoechst específica de ADN para la visualización del núcleo celular (Figura 4 a). La cuantificación de la intensidad de la tinción de inmunofluorescencia mostró que BNT162b2 aumentó los niveles de proteína LINE-1 ORF1p tanto en el área de la célula completa como en el núcleo en todas las concentraciones probadas (Figura 4 b-d).

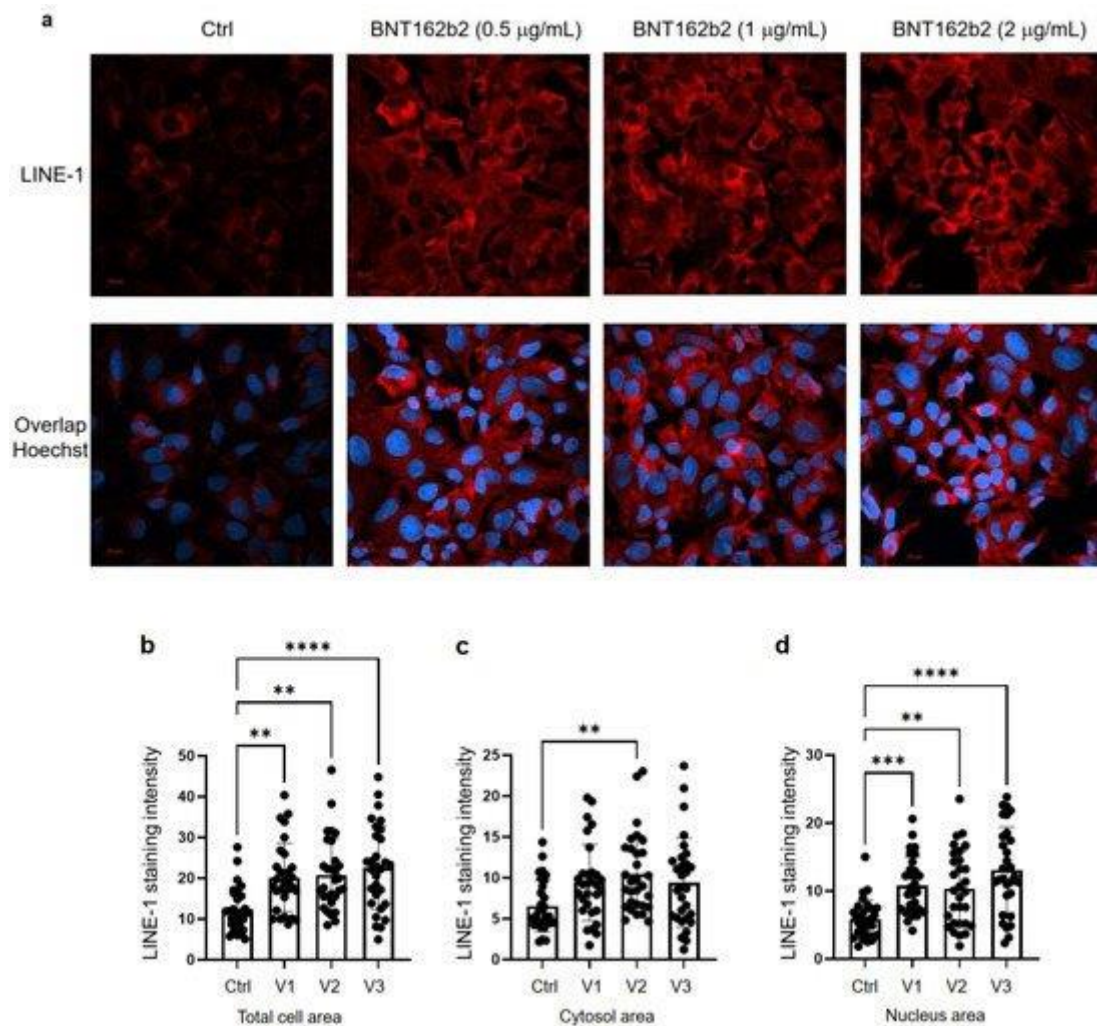


Figura 4. Inmunohistoquímica de células Huh7 tratadas con BNT162b2 en la distribución de proteínas LINE-1. Las células Huh7 se trataron sin (Ctrl) o con 0,5, 1 y 2 µg/ml de BNT162b2 durante 6 h. Las células se fijaron y tiñeron con anticuerpos que se unen a LINE-1 ORF1p (rojo) y la sonda Hoechst específica de ADN para la visualización del núcleo celular (azul). (a) Imágenes representativas de la expresión de LINE-1 en células Huh7 tratadas con o sin BNT162b2. (b - d) Cuantificación de la proteína LINE-1 en el área celular completa (b), citosol (c) y núcleo (d). Todos los datos se analizaron con ANOVA unidireccional y los gráficos se crearon con GraphPad Prism V 9.2. Todos los datos se presentan como media \pm SD (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ como se indica).

3.3. Detección de ADN BNT162b2 transcrito de forma inversa en células Huh7

Un estudio anterior ha demostrado que la entrada de la proteína LINE-1 en el núcleo está asociada con la retrotransposición [35]. En el experimento de tinción de inmunofluorescencia descrito anteriormente, ya se observaron niveles aumentados de LINE-1 en el núcleo a la concentración más baja de BNT162b2 (0,5 µg/mL). Para examinar si BNT162b2 se transcribe inversamente en ADN cuando LINE-1 está elevado, purificamos ADN genómico de células Huh7 tratadas con 0,5 µg/mL de BNT162b2 durante 6, 24 y 48 h. El ADN purificado se trató con RNasa para eliminar el ARN y se sometió a PCR utilizando cebadores dirigidos a BNT162b2, como se ilustra en la [Figura 1](#). A continuación, los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron mediante electroforesis y se purificaron en gel ([Figura 5](#)). Se detectaron amplicones de ADN

BNT162b2 en los tres puntos de tiempo (6, 24 y 48 h). La secuenciación de Sanger confirmó que los amplicones de ADN eran idénticos a la secuencia BNT162b2 flanqueada por los cebadores ([Tabla 2](#)). Para garantizar que los amplicones de ADN derivaran de ADN pero no de ARN de BNT162b2, también realizamos PCR en ARN purificado de células Huh7 tratadas con 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de BNT162b2 durante 6 h, con o sin tratamiento con RNasa (Ctrl 5 y 6 en la [Figura 5](#)), y no se detectó amplicón en las muestras de ARN sometidas a PCR.

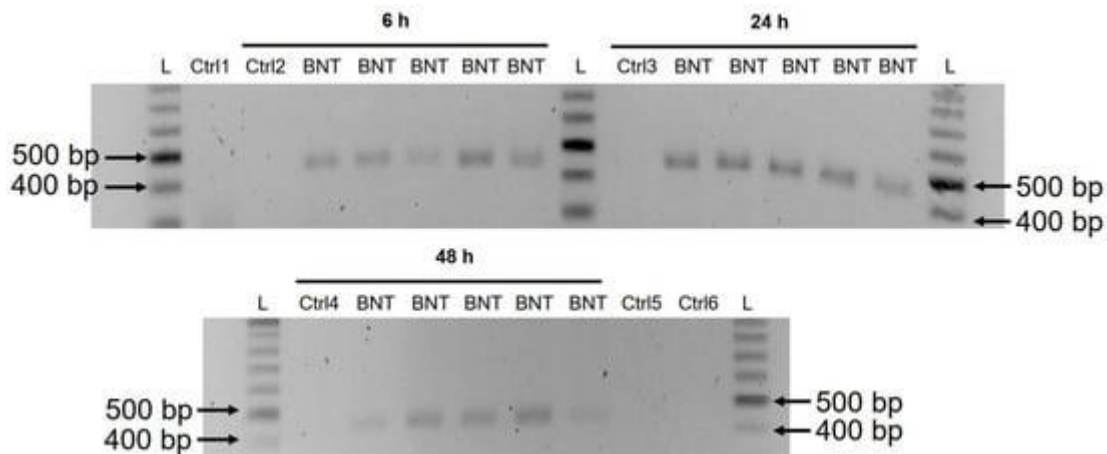


Figura 5. Detección de amplicones de ADN de BNT162b2 en células Huh7 tratadas con BNT162b2. Las células Huh7 se trataron sin (Ctrl) o con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de BNT162b2 durante 6, 24 y 48 h. El ADN genómico se purificó y digirió con 100 $\mu\text{g/ml}$ de RNasa. Se ejecutó PCR en todas las muestras con cebadores dirigidos a BNT162b2, como se muestra en la [Figura 1](#) y la [Tabla 1](#). Los amplicones de ADN (444 pb) se visualizaron en gel de agarosa. BNT: BNT162b2; L: escalera de ADN; Ctrl1: células Huh7 cultivadas; Ctrl2: células Huh7 sin tratamiento con BNT162b2 recolectadas a las 6 h; Ctrl3: células Huh7 sin tratamiento con BNT162b2 recolectadas a las 24 h; Ctrl4: células Huh7 sin tratamiento con BNT162b2 recolectadas a las 48 h; Ctrl5: ARN de células Huh7 tratadas con 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de BNT162b2 durante 6 h; Ctrl6: ARN de células Huh7 tratadas con 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de BNT162b2 durante 6 h, digeridas con RNasa.

Tabla 2. Resultado de la secuenciación de Sanger del amplicón BNT162b2.

4. Discusión

En este estudio, presentamos evidencia de que la vacuna de ARNm de COVID-19 BNT162b2 puede ingresar a la línea celular de hígado humano Huh7 in vitro. El ARNm de BNT162b2 se transcribe de forma inversa intracelularmente en ADN tan rápido como 6 h después de la exposición a BNT162b2. Un posible mecanismo para la transcripción inversa es a través de la transcriptasa inversa endógena LINE-1, y la distribución de la proteína del núcleo de LINE-1 es elevada por BNT162b2.

La acumulación intracelular de LNP en los hepatocitos se ha demostrado in vivo [[36](#)]. Un estudio preclínico sobre BNT162b2 mostró que BNT162b2 ingresa a la línea celular humana de células HEK293T y conduce a una expresión robusta del antígeno BNT162b2 [[37](#)]. Por lo tanto, en este estudio, primero investigamos la entrada de

BNT162b2 en las células Huh7 de la línea celular de hígado humano. La elección de las concentraciones de BNT162b2 utilizadas en este estudio merece una explicación. BNT162b2 se administra en una serie de dos dosis con tres semanas de diferencia, y cada dosis contiene 30 µg de BNT162b2 en un volumen de 0,3 ml, lo que hace que la concentración local en el sitio de inyección sea la más alta de 100 µg/ml [31]. Un estudio anterior sobre las vacunas de ARNm contra los virus de la influenza H10N8 y H7N9 usando un sistema de administración de LNP similar mostró que la vacuna de ARNm puede distribuirse de manera bastante inespecífica a varios órganos como el hígado, el bazo, el corazón, los riñones, los pulmones y el cerebro, y la concentración en el hígado es aproximadamente 100 veces más bajo que el del sitio de inyección intramuscular [38]. En el informe de evaluación de BNT162b2 proporcionado a EMA por Pfizer, los estudios de distribución farmacocinética en ratas demostraron que una proporción relativamente grande (hasta el 18 %) de la dosis total se distribuye en el hígado [26 1]. Por lo tanto, elegimos usar 0,5, 1 y 2 µg/mL de vacuna en nuestros experimentos con células hepáticas. Sin embargo, el efecto de un rango más amplio de concentraciones más bajas y más altas de BNT162b2 también debe verificarse en estudios futuros.

En el estudio actual, empleamos una línea celular de hígado humano para la investigación *in vitro*. Vale la pena investigar si las células hepáticas también presentan la proteína espiga del SARS-CoV-2 derivada de la vacuna, lo que podría hacer que las células hepáticas sean objetivos para las células T citotóxicas reactivas a la proteína espiga previamente cebadas. Ha habido informes de casos de personas que desarrollaron hepatitis autoinmune [39] después de la vacunación BNT162b2. Para obtener una mejor comprensión de los efectos potenciales de BNT162b2 en la función hepática, se desean modelos *in vivo* para estudios futuros.

En el informe de toxicidad de BNT162b2, no se proporcionaron estudios de genotoxicidad ni de carcinogenicidad [26]. Nuestro estudio muestra que BNT162b2 se puede transcribir inversamente a ADN en la línea de células hepáticas Huh7, y esto puede generar la preocupación de que el ADN derivado de BNT162b2 se integre en el genoma del huésped y afecte la integridad del ADN genómico, lo que podría mediar potencialmente en la genotoxicidad. efectos secundarios. En esta etapa, no sabemos si el ADN transcrito de forma inversa a partir de BNT162b2 se integra en el genoma celular. Se necesitan más estudios para demostrar el efecto de BNT162b2 en la integridad genómica, incluida la secuenciación del genoma completo de las células expuestas a BNT162b2, así como tejidos de sujetos humanos que recibieron la vacuna BNT162b2.

El retrotransposón autónomo humano LINE-1 es una transcriptasa inversa endógena celular y el único transposón activo que queda en humanos, capaz de retrotransponerse a sí mismo y a otros elementos no autónomos [40 , 41], y ~17 % del genoma humano está compuesto por secuencias LINE-1 [42]. Los elementos *Alu* no autónomos , los elementos de nucleótidos intercalados cortos (SINE), el número variable de repeticiones en tándem (VNTR), así como los pseudogenes procesados por ARNm celular, son retrotranspuestos por las proteínas de retrotransposición LINE-1 que trabajan en *trans* [43]. , 44]. Un estudio reciente mostró que el LINE-1 endógeno media la transcripción inversa y la integración de las secuencias del SARS-CoV-2 en los genomas de las células humanas infectadas [25]. Además, la expresión de LINE-1 endógeno a menudo aumenta con la infección viral, incluida la infección por SARS-CoV-2 [45 , 46 , 47]. Estudios previos demostraron que la actividad de retrotransposición de LINE-1 está regulada por el metabolismo del ARN [48 , 49], la respuesta al daño del ADN [50] y la autofagia [51]. La retrotransposición eficiente de LINE-1 a menudo se asocia con el ciclo celular y la ruptura de la envoltura nuclear durante la mitosis [52 , 53],

así como retrovirus exógenos [54 , 55], que promueve la entrada de LINE-1 en el núcleo. En nuestro estudio, observamos una distribución aumentada de LINE-1 ORF1p según lo determinado por inmunohistoquímica en el núcleo por BNT162b2 en todas las concentraciones probadas (0.5, 1 y 2 µg/mL), mientras que niveles elevados de *LINE-1* la expresión génica se detectó en la concentración más alta de BNT162b2 (2 µg/mL). Vale la pena señalar que la transcripción de genes está regulada por modificaciones de la cromatina, la regulación del factor de transcripción y la tasa de degradación del ARN, mientras que la regulación de la traducción de proteínas implica el reclutamiento de ribosomas en el codón de iniciación, la modulación de la elongación de péptidos, la terminación de la síntesis de proteínas o la biogénesis de los ribosomas. . Estos dos procesos están controlados por diferentes mecanismos y, por lo tanto, es posible que no siempre muestren los mismos patrones de cambio en respuesta a desafíos externos. La regulación exacta de la actividad de LINE-1 en respuesta a BNT162b2 merece más estudio.

El modelo celular que utilizamos en este estudio es una línea celular de carcinoma, con replicación de ADN activa que difiere de las células somáticas que no se dividen. También se ha demostrado que las células Huh7 muestran una expresión significativamente diferente de genes y proteínas, incluidas proteínas reguladas al alza involucradas en el metabolismo del ARN [56]. Sin embargo, la proliferación celular también está activa en varios tejidos humanos, como la médula ósea o las capas basales del epitelio, así como durante la embriogénesis y, por lo tanto, es necesario examinar el efecto de BNT162b2 sobre la integridad genómica en tales condiciones. Además, la retrotransposición efectiva de LINE-1 también se ha informado en células que no se dividen y diferenciadas terminalmente, como las neuronas humanas [57 , 58].

El informe de evaluación de Pfizer EMA también mostró que BNT162b2 se distribuye en el bazo (<1,1 %), las glándulas suprarrenales (<0,1 %), así como una radiactividad baja y medible en los ovarios y testículos (<0,1 %) [26]. Además, no hay datos disponibles sobre la transferencia placentaria de BNT162b2 en el informe de evaluación de Pfizer EMA. Nuestros resultados mostraron que el ARNm de BNT162b2 entra fácilmente en las células Huh7 a una concentración (0,5 µg/ml) correspondiente al 0,5 % de la concentración local en el lugar de la inyección, induce cambios en la expresión del gen y la proteína LINE-1 y, en 6 h, la transcripción inversa de BNT162b2 puede ser detectado. Por lo tanto, es importante investigar más a fondo el efecto de BNT162b2 en otros tipos de células y tejidos, tanto in vitro como in vivo.

5. Conclusiones

Nuestro estudio es el primer estudio in vitro sobre el efecto de la vacuna de ARNm de COVID-19 BNT162b2 en la línea celular de hígado humano. Presentamos evidencia sobre la entrada rápida de BNT162b2 en las células y la posterior transcripción inversa intracelular de ARNm de BNT162b2 en ADN.

Materiales complementarios

La siguiente información de apoyo se puede descargar en: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cimb44030073/s1> .

Contribuciones de autor

MA, FOF, DY, MB y CL realizaron experimentos in vitro. MA y FOF realizaron análisis de datos. MR YDM y contribuido a la ejecución de la investigación, diseñado y supervisado el estudio. YDM escribió el artículo con aportes de todos los autores. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Fondos

Este estudio fue apoyado por el Consejo de Investigación Sueco, Área de Investigación Estratégica Exodiab, Dnr 2009-1039, el Fondo del Gobierno Sueco para la Investigación Clínica (ALF) y la fundación del Hospital Universitario Skåne.

Declaración de la Junta de Revisión Institucional

No aplica.

Declaración de consentimiento informado

No aplica.

Declaración de disponibilidad de datos

Todos los datos que respaldan los hallazgos de este estudio están disponibles en el artículo y en [la información de respaldo](#) .

Expresiones de gratitud

Los autores agradecen a Sven Haidl, Maria Josephson, Enming Zhang, Jia-Yi Li, Caroline Haikal y Pradeep Bompada por su apoyo en este estudio.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Panel de control del coronavirus (COVID-19). Disponible en línea: <https://covid19.who.int/> (consultado el 22 de febrero de 2022).
2. Mulligan, MJ; Lyke, KE; Kitchin, N.; Absalón, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Neuzil, K.; Raabe, V.; Bailey, R.; Swanson, KA; et al. Estudio de fase I/II de la vacuna de ARN COVID-19 BNT162b1 en adultos. *Naturaleza* **2020** , 586 , 589–593. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Walsh, EE. UU.; Frenck, RW, Jr.; Falsey, AR; Kitchin, N.; Absalón, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Neuzil, K.; Mulligan, MJ; Bailey, R.; et al. Seguridad e inmunogenicidad de dos vacunas candidatas contra la COVID-19 basadas en ARN. *N. ingl. J. Med.* **2020** , 383 , 2439–2450. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. polaco, FP; Tomás, SJ; Kitchin, N.; Absalón, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Pérez, JL; Pérez Marc, G.; Moreira, ED; Zerbini, C.; et al. Seguridad y eficacia de la

- vacuna COVID-19 de ARNm BNT162b2. *N. ingl. J. Med.* **2020**, *383*, 2603–2615. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Harris, RJ; Pasillo, JA; Zaidi, A.; Andrews, Nueva Jersey; Dunbar, JK; Dabrera, G. Efecto de la vacunación en la transmisión doméstica del SARS-CoV-2 en Inglaterra. *N. ingl. J. Med.* **2021**, *385*, 759–760. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 6. trasero, AA; Omer, SB; Yan, P.; Sheikh, OS; Mayr, FB Eficacia de la vacuna contra el SARS-CoV-2 en una población nacional de alto riesgo en un entorno real. *Ana. Interno. Medicina.* **2021**, *174*, 1404–1408. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 7. Dagan, N.; Barda, N.; Kepten, E.; Mirón, O.; Perchik, S.; Katz, MA; Hernán, MA; Lipsich, M.; Reyes, B.; Balicer, RD BNT162b2 mRNA Covid-19 Vacuna en un entorno de vacunación masiva a nivel nacional. *N. ingl. J. Med.* **2021**, *384*, 1412–1423. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 8. Rossman, H.; Shilo, S.; Meir, T.; Gorfine, M.; Shalit, U.; Segal, E. Dinámica de COVID-19 después de un programa nacional de inmunización en Israel. *Nat. Medicina.* **2021**, *27*, 1055–1061. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 9. Abanico, SER; Shen, JY; Lim, XR; Tu, TM; Chang, CCR; Khin, HSW; Koh, JS; Rao, JP; Lau, SL; bronceado, GB; et al. Trombosis venosa cerebral posterior a la vacunación con ARNm BNT162b2 SARS-CoV-2: un evento de cisne negro. *Soy. J. Hematol.* **2021**, *96*, E357–E361. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 10. Larson, KF; Ammirati, E.; Adler, ED; Cooper, LT, Jr.; Hong, KN; Saponara, G.; Couri, D.; Cereda, A.; Procopio, A.; Cavalotti, C.; et al. Miocarditis después de la vacunación con BNT162b2 y mRNA-1273. *Circulación* **2021**, *144*, 506–508. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 11. Menni, C.; Klaser, K.; Mayo, A.; Polidori, L.; Capdevila, J.; Louca, P.; Sudre, CH; Nguyen, LH; Drew, DA; Merino, J.; et al. Efectos secundarios de la vacuna e infección por SARS-CoV-2 después de la vacunación en usuarios de la aplicación COVID Symptom Study en el Reino Unido: un estudio observacional prospectivo. *Lanceta Infectada. Dis.* **2021**, *21*, 939–949. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 12. Hansen, T.; Titze, U.; Kulamadayil-Heidenreich, NSA; Glombitza, S.; Tebbe, JJ; Rocken, C.; Schulz, B.; Weise, M.; Wilkens, L. Primer caso de estudio post mortem en un paciente vacunado contra el SARS-CoV-2. *En t. J. infectar. Dis.* **2021**, *107*, 172–175. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 13. Kadali, RAK; Janagama, R.; Perurú, S.; Malayala, SV Efectos secundarios de la vacuna BNT162b2 mRNA COVID-19: un estudio transversal aleatorizado con síntomas detallados autoinformados por trabajadores de la salud. *En t. J. infectar. Dis.* **2021**, *106*, 376–381. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 14. Parkash, O.; Sharko, A.; Farooqi, A.; Ying, GW; Sura, P. Pancreatitis aguda: un posible efecto secundario de la vacuna COVID-19. *Cureus* **2021**, *13*, e14741. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 15. Mazzatenta, C.; Piccolo, V.; ritmo, G.; Romano, I.; Argenziano, G.; Bassi, A. Lesiones purpúricas en los párpados desarrolladas después de la vacuna COVID-19 de ARNm BNT162b2: ¿Otra pieza del rompecabezas de la piel del

- SARS-CoV-2? *J.Eur. Academia Dermatol. Venereol.* **2021** , 35 , e543–e545. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
16. Lee, EJ; Cines, DB; Gernsheimer, T.; Kessler, C.; Miguel, M.; Tarantino, MD; Semple, JW; Arnold, DM; Godeau, B.; Lambert, parlamentario; et al. Trombocitopenia después de la vacunación de Pfizer y Moderna SARS-CoV-2. *Soy. J. Hematol.* **2021** , 96 , 534–537. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 17. Ishay, Y.; Kenig, A.; Tsemach-Toren, T.; Amer, R.; Rubín, L.; Hershkovitz, Y.; Kharouf, F. Fenómenos autoinmunes después de la vacunación contra el SARS-CoV-2. *En t. inmunofarmac.* **2021** , 99 , 107970. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 18. Das, BB; Kohli, U.; Ramachandran, P.; Nguyen, HH; Greil, G.; Hussain, T.; Tandon, A.; Kane, C.; Avula, S.; Durú, C.; et al. Miopericarditis después de la vacunación de ARNm COVID-19 en adolescentes de 12 a 18 años de edad. *J. Pediatría.* **2021** , 238 , 26–32.e1. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 19. McLaurin-Jiang, S.; Garner, CD; Krutsch, K.; Hale, TW Síntomas maternos e infantiles después de la vacunación contra el COVID-19 entre madres que amamantan. *Amamantar. Medicina.* **2021** , 16 , 702–709. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 20. Barda, N.; Dagan, N.; Ben-Shlomo, Y.; Kepten, E.; Waxman, J.; Ohana, R.; Hernán, MA; Lipsich, M.; Kohane, I.; Netzer, D.; et al. Seguridad de la vacuna Covid-19 de ARNm BNT162b2 en un entorno nacional. *N. ingl. J.Med.* **2021** , 385 , 1078–1090. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 21. Badén, LR; El Sahly, HM; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, SA; Roupheal, N.; Creech, CB; et al. Eficacia y seguridad de la vacuna mRNA-1273 SARS-CoV-2. *N. ingl. J.Med.* **2021** , 384 , 403–416. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 22. Sadoff, J.; Gris, G.; Vandebosch, A.; Cárdenas, V.; Shukarev, G.; Grinsztejn, B.; Goepfert, Pensilvania; Truysers, C.; Fennema, H.; Spiessens, B.; et al. Seguridad y eficacia de la vacuna Ad26.COV2.S monodosis frente al Covid-19. *N. ingl. J.Med.* **2021** , 384 , 2187–2201. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 23. Eichinger, S.; Warkentin, TE; Greinacher, A. Trombocitopenia trombótica después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19. Respuesta. *N. ingl. J.Med.* **2021** , 385 , e11. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 24. Doroftei, B.; Ciobica, A.; Ilie, OD; Maftei, R.; Ilea, C. Minirevisión sobre la confiabilidad y la eficiencia de las vacunas contra el COVID-19. *Diagnóstico* **2021** , 11 , 579. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 25. Zhang, L.; Richards, A.; Barrasa, MI; Hughes, SH; Joven, RA; Jaenisch, R. El ARN del SARS-CoV-2 con transcripción inversa puede integrarse en el genoma de células humanas cultivadas y puede expresarse en tejidos derivados de pacientes. *proc. nacional Academia ciencia EE. UU.* **2021** , 118 , e2105968118. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 26. Disponible en línea: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (consultado el 24 de febrero de 2022).
 27. Tanaka, H.; Takata, N.; Sakurai, Y.; Yoshida, T.; Inoué, T.; Tamagawa, S.; Nakai, Y.; Tange, K.; Yoshioka, H.; Maeki, M.; et al. Suministro de

- oligonucleótidos utilizando un material similar a un lípido autodegradable. *Farmacéutica* **2021**, *13*, 544. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
28. Sedic, M.; Senn, JJ; Lynn, A.; Laska, M.; Smith, M.; Platz, SJ; Bolén, J.; Hoge, S.; Bulychev, A.; Jacquinet, E.; et al. Evaluación de la seguridad del ARNm modificado formulado con nanopartículas lipídicas en la rata Sprague-Dawley y el mono *Cynomolgus*. *Veterinario. Patol.* **2018**, *55*, 341–354. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 29. Sato, Y.; Matsui, H.; Yamamoto, N.; Sato, R.; Munakata, T.; Kohara, M.; Harashima, H. La entrega altamente específica de siRNA a los hepatocitos evita la toxicidad asociada a las nanopartículas lipídicas mediada por células endoteliales, lo que conduce a la disminución segura y eficaz del virus de la hepatitis B. *J.Control. Publicación* **2017**, *266*, 216–225. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 30. Heidel, JD; Yu, Z.; Liu, JY; Relé, SM; Liang, Y.; Zeidan, RK; Kornbrust, DJ; Davis, ME Administración en primates no humanos de dosis intravenosas crecientes de nanopartículas dirigidas que contienen ARNip de la subunidad M2 de la ribonucleótido reductasa. *proc. nacional Academia ciencia EE . UU.* **2007**, *104*, 5715–5721. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 31. Disponible en línea: <https://www.cvdvaccine-us.com/> (consultado el 24 de febrero de 2022).
 32. Disponible en línea: [http://bridgeslab.sph.umich.edu/protocols/index.php/Preparation_of_Tail_Samples_\(for_Genotyping\)](http://bridgeslab.sph.umich.edu/protocols/index.php/Preparation_of_Tail_Samples_(for_Genotyping)) (consultado el 24 de febrero de 2022).
 33. Gallud, A.; Munson, MJ; Liu, K.; Idström, A.; Barriga, HM; Tabaei, S.; Aliakbarinodehi, N.; Ojansivu, M.; Lubart, Q.; Douth, JJ; et al. El tiempo de evolución del desprendimiento de PEG y la coronación de proteínas séricas determina la cinética de absorción celular y el suministro de nanopartículas lipídicas. *bioRxiv* **2021**. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 34. ARN mensajero de la Organización Mundial de la Salud que codifica la glicoproteína Spike de SARS-CoV-2 de longitud completa. 2020. Disponible en línea: <https://web.archive.org/web/20210105162941/https://mednet-communities.net/inn/db/media/docs/11889.doc> (consultado el 24 de febrero de 2022).
 35. Mita, P.; Wudzinska, A.; Sol, X.; Andrade, J.; Nayak, S.; Kahler, DJ; Badri, S.; La Cava, J.; Überheide, B.; Yun, CY; et al. Localización de la proteína LINE-1 y dinámica funcional durante el ciclo celular. *Elife* **2018**, *7*, e30058. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 36. Sato, Y.; Kinami, Y.; Hashiba, K.; Harashima, H. Diferentes cinéticas para la captación hepática de nanopartículas lipídicas entre la apolipoproteína E/receptor de lipoproteínas de baja densidad y la vía del receptor de N-acetil-D-galactosamina/asialoglicoproteína. *J.Control. Publicación* **2020**, *322*, 217–226. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
 37. Vogel, AB; Kanevsky, I.; Che, Y.; Swanson, KA; Muik, A.; Vormehr, M.; Kranz, LM; Walzer, KC; Hein, S.; Guler, A.; et al. Las vacunas BNT162b protegen a los macacos rhesus del SARS-CoV-2. *Naturaleza* **2021**, *592*, 283–289. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Bahl, K.; Senn, JJ; Yuzhakov, O.; Bulychev, A.; Brito, LA; Hasset, KJ; Laska, YO; Smith, M.; Almarsson, O.; Thompson, J.; et al. Demostración preclínica y clínica de la inmunogenicidad de las vacunas de ARNm contra los virus de la influenza H10N8 y H7N9. *mol. El r.* **2017**, *25*, 1316–1327. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Brill, F.; Al Diffalha, S.; Decano, M.; Fetting, DM Desarrollo de hepatitis autoinmune después de la vacuna contra la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19): ¿Causalidad o casualidad? *J. Hepatol.* **2021**, *75*, 222–224. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
40. Kazazian, HH, Jr.; Moran, JV ADN móvil en salud y enfermedad. *N. ingl. J. Med.* **2017**, *377*, 361–370. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Ataúd, JM; Fan, H. El descubrimiento de la transcriptasa inversa. *año Reverendo Virol.* **2016**, *3*, 29–51. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
42. Lander, ES; Linton, LM; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, MC; Balduino, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; Fitz Hugh, W.; et al. Secuenciación inicial y análisis del genoma humano. *Naturaleza* **2001**, *409*, 860–921. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
43. Ostertag, EM; Goodier, JL; Zhang, Y.; Kazazian, HH, Jr. Los elementos SVA son retrotransposones no autónomos que causan enfermedades en humanos. *Soy. J. Hum. Gineta.* **2003**, *73*, 1444–1451. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
44. Hancks, CC; Kazazian, HH, Jr. Retrotransposones humanos activos: variación y enfermedad. *actual Opinión Gineta. desarrollo* **2012**, *22*, 191–203. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
45. Jones, RB; Canción, H.; Xu, Y.; Guarnición, KE; Buzdin, AA; Anwar, N.; cazador, DV; Mujib, S.; Mihajlovic, V.; Martín, E.; et al. El ADN del elemento retrotransponible LINE-1 se acumula en las células infectadas por el VIH-1. *J. Virol.* **2013**, *87*, 13307–13320. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
46. Macchietto, MG; Langlois, RA; Shen, Regulación positiva de la expresión de elementos transponibles inducida por el virus SS en células huésped humanas y de ratón. *Ciencias de la vida Alianza* **2020**, *3*, e201900536. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Yin, Y.; Liu, XZ; él, X.; Zhou, el coronavirus exógeno LQ interactúa con el retrotransposón endógeno en células humanas. *Frente. Infección celular. Microbiol.* **2021**, *11*, 609160. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Belancio, vicepresidente; Roy-Engel, AM; Deininger, P. El impacto de múltiples sitios de empalme en elementos L1 humanos. *Gene* **2008**, *411*, 38–45. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Dai, L.; Taylor, MS; O'Donnell, KA; Boeke, JD La proteína C1 de unión a poli(A) es esencial para una retrotransposición eficiente de L1 y afecta la formación de L1 RNP. *mol. Biol celular.* **2012**, *32*, 4323–4336. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
50. Siervo, G.; Strevia, VA; Derbes, RS; Wijetunge, MI; Neeland, M.; Blanco, tuberculosis; Belancio, vicepresidente; Roy-Engel, AM; Deininger, PL La vía de reparación por escisión de nucleótidos limita la retrotransposición L1. *Genética* **2017**, *205*, 139–153. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]

51. Guo, H.; Chitiprolu, M.; Gagnon, D.; Meng, L.; Pérez-Iratxeta, C.; Lagace, D.; Gibbings, D. Autophagy respalda la estabilidad genómica al degradar el ARN retrotransposón. *Nat. común* **2014**, *5*, 5276. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
52. Xie, Y.; Mates, L.; Ivics, Z.; Izsvak, Z.; Martín, SL; An, W. La división celular promueve la retrotransposición eficiente en una línea celular informadora L1 estable. *Multitud. ADN* **2013**, *4*, 10. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
53. Shi, X.; Seluanov, A.; Gorbunova, V. Se requieren divisiones celulares para la retrotransposición L1. *mol. Biol. celular*. **2007**, *27*, 1264–1270. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
54. Goff, SP Factores del huésped explotados por retrovirus. *Nat. Rev. Microbiol* **2007**, *5*, 253–263. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
55. Suzuki, Y.; Craigie, R. El camino hacia la cromatina: entrada nuclear de retrovirus. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 187–196. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)]
56. Shi, J.; Wang, X.; Lyu, L.; Jiang, H.; Zhu, HJ Comparación de la expresión de proteínas entre los hígados humanos y las líneas celulares hepáticas HepG2, Hep3B y Huh7 usando proteómica SWATH y MRM-HR: Centrándose en las enzimas metabolizadoras de fármacos. *Metab de drogas farmacocinética*. **2018**, *33*, 133–140. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kubo, S.; Seleme, MC; Soifer, HS; Pérez, JL; Morán, JV; Kazazian, HH, Jr.; Kasahara, N. Retrotransposición de L1 en células somáticas humanas primarias y que no se dividen. *proc. nacional Academia ciencia EE . UU.* **2006**, *103*, 8036–8041. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Maciá, A.; Widmann, T]; Heras, SR; Ayllón, V.; Sánchez, L.; Benkaddour-Boumzaouad, M.; Muñoz-López, M.; Rubio, A.; Amador-Cubero, S.; Blanco-Jiménez, E.; et al. Retrotransposición LINE-1 diseñada en neuronas humanas que no se dividen. *Genoma Res.* **2017**, *27*, 335–348. [[Google Académico](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Nota del editor: MDPI se mantiene neutral con respecto a reclamos jurisdiccionales en mapas publicados y afiliaciones institucionales.