



Artículo

Transcripción inversa intracelular de Pfizer BioNTech Vacuna de ARNm COVID-19 BNT162b2 In Vitro en hígado humano Línea celular

Markus Aldén ¹, Francisko Olofsson Falla ¹, Daowei Yang ¹, Mohammad Barghouth ¹, Cheng Luan ¹, Magnus Rasmussen ² y Yang De Marinis ^{1,*}



Clínicas, Universidad de Lund, 22362 Lund, Suecia; magnus.rasmussen@med.lu.se

* Correspondencia: yang.de_marinis@med.lu.se

Citación: Aldén, M.; Olofsson Falla, F.; Yang, D.; Barghouth, M.; Luan, C.; Rasmussen, M.; De Marinis, Y.

Transcripción inversa intracelular de ARNm de COVID-19 de Pfizer BioNTech Vacuna BNT162b2 in vitro en línea celular hepática humana. *Curr. Temas Mol. Biol.*

2022, 44, 1115–1126.

<https://doi.org/10.3390/cimb44030073>

Editor académico: Stephen Malnick

Recibido: 18 Enero 2022

Aprobado: 23 Febrero 2022

Publicado: 25 Febrero 2022

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



Derechos de autor: © 2022 por los autores. Licenciario MDPI, Basilea, Suiza. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

¹ Departamento de Ciencias Clínicas, Universidad de Lund, 20502 Malmö, Suecia; ma7440al-s@student.lu.se (M.A.); francisko.olofsson@gmail.com (F.O.F.); daowei.yang@med.lu.se (D.Y.); mohammad.barghouth@med.lu.se (M.B.); cheng.luan@med.lu.se (C.L.)

² Medicina de infecciones, Departamento de Ciencias

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

Palabras clave: Vacuna de ARNm contra la COVID-19; BNT162b2; hígado; transcripción inversa; LÍNEA-1; Eh7

1. Introducción

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) causada por el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (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. A partir de febrero de 2022, COVID-19 ha provocado más de 430 millones de casos de infección reportados y 5,9 millones de muertes en todo el mundo [1]. Se necesitan urgentemente 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 especial atención a las vacunas de ARNm (de Pfizer-BioNTech y Moderna), las vacunas de vectores adenovirales recombinantes con replicación defectuosa (de Janssen-Johnson and Johnson, Astra-Zeneca, Sputnik-V y CanSino) y las vacunas inactivadas (de Sinopharm, Bharat Biotech y Sinovac). La vacuna de ARNm tiene las ventajas de ser flexible y eficiente en el diseño y fabricación de inmunógenos, y actualmente, numerosas vacunas candidatas se encuentran en diversas etapas de desarrollo y aplicación. Específicamente, la vacuna de ARNm COVID-19 BNT162b2 desarrollada por Pfizer y BioNTech se ha evaluado en ensayos clínicos exitosos [2–4] y se ha administrado en campañas nacionales de vacunación contra COVID-19 en diferentes regiones del mundo [5–8].

BNT162b2 es una vacuna de ARN encapsulada en nucleósidos (modRNA) encapsulada en nanopartículas lipídicas (LNP) y codifica la longitud completa de la proteína de pico (S) del SARS-CoV-2, modificada

por dos mutaciones de prolina para asegurar una conformación antigénicamente óptima antes de la fusión, que imita el virus intacto para provocar anticuerpos neutralizantes del 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, aún quedan muchos desafíos, incluido el monitoreo de la seguridad y eficacia a largo plazo de la vacuna. Esto justifica una mayor evaluación e investigaciones. El perfil de seguridad de BNT162b2 actualmente solo está disponible en estudios clínicos a corto plazo. Se han reportado efectos adversos menos comunes de BNT162b2, incluyendo pericarditis, arritmia, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio, hemorragia intracraneal y trombocitopenia [4,9–20]. También hay estudios que informan sobre los efectos adversos observados en otros tipos de vacunas [21–24]. Para comprender mejor los mecanismos subyacentes a los efectos adversos relacionados con la vacuna, se necesitan investigaciones clínicas, así como análisis celulares y moleculares.

Un estudio reciente mostró que los ARN del SARS-CoV-2 pueden transcribirse inversamente e integrarse en el genoma de las células humanas [25]. Esto plantea la cuestión de si esto también puede ocurrir con BNT162b2, que codifica 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 luciferasa. La radiactividad se detectó en la mayoría de los tejidos desde el primer punto de tiempo (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 a las 8–48 h después de la dosis [26]. Además, en animales que recibieron la inyección de BNT162b2, se observaron efectos hepáticos reversibles, incluyendo agrandamiento del hígado, vacuolación, 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 reportado previamente [27–30], 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 hepática humana *in vitro* e investigar si BNT162b2 puede transcribirse inversamente en ADN a través de mecanismos endógenos.

2. Materiales y métodos

2.1. Cultivo celular

Las células Huh7 (JCRB Cell Bank, Osaka, Japón) se cultivaron en 37 °C al 5% de CO_2 con medio DMEM (HyClone, HYCLSH30243.01) suplementado con suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, F7524-500ML, Burlington, MA, EUA) y 1% (v/v) de penicilinaestreptomicina (HyClone, SV30010, Logan, UT, EUA). Para el tratamiento con BNT162b2, las células Huh7 se sembraron con una densidad de 200.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos. La vacuna de ARNm BNT162b2 (Pfizer BioNTech, Nueva York, NY, EUA) se diluyó con una inyección estéril de cloruro de sodio al 0,9%, USP en una concentración final de 100 μg / ml como se describe en la guía del fabricante [31]. Luego se agregó la suspensión de BNT162b2 en medios de cultivo celular para alcanzar concentraciones finales de 0,5, 1,0 o 2,0 μg / 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 cosecharon mediante tripsinización y se almacenaron en -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 utilizando el kit de síntesis de ADNc de primera cadena RevertAid (Thermo Fisher Scientific, K1622, Waltham, MA, EUA) 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, EUA) con cebadores para BNT162b2, *LINE-1* y genes de mantenimiento *ACTB* y *GAPDH* (Tabla 1).

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

Blanco	Secuencia
ACTB adelante	CCTCGCCTTTGCCGATCC
Reverso de ACTB	GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC
GAPDH hacia adelante	CTCTGCTCCTCTGTTCGAC
GAPDH inversa	TTAAAAGCAGCCCTGGTGAC
LINE-1 hacia adelante	TAACCAATACAGAGAAGTGC
LINE-1 reverso	GATAATATCCTGCAGAGT
BNT162b2 hacia adelante	CGAGGTGGCCAAGAATCTGA
BNT162b2 inversa	TAGGCTAAGCGTTTTGAGCTG

2.3. Tinción por inmunofluorescencia e imagen confocal

Las células Huh7 se cultivaron en portaobjetos de ocho cámaras (LAB-TEK, 154534, Santa Cruz, CA, EUA) con una densidad de 40.000 células/pocillo, con o sin BNT162b2 (0,5, 1 o 2 µg/ml) durante 6 h. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos primarios anticuerpo monoclonal de ratón anti-LINE-1 ORF1p (Merck, 3574308, Kenilworth, NJ, EUA), anticuerpo secundario Cy3 Donkey anti-ratón (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA) y Hoechst (Life technologies, 34850, Carlsbad, CA, EUA), siguiendo el protocolo de Thermo Fisher (Waltham, MA, EUA). Se tomaron dos imágenes por condición utilizando un Zeiss LSM 800 y un objetivo de inmersión en aceite 63X, y la intensidad de tinción se cuantificó en el área celular 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 células se les asignó un número aleatorio para evitar el sesgo. Para marcar los núcleos (determinados por la tinción de Hoechst) y las células enteras (determinadas por los bordes de la fluorescencia LINE-1), se utilizó la herramienta de selección Freehand. Luego se midieron estas áreas y se utilizó la intensidad media para comparar los grupos.

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

El ADN genómico se extrajo de gránulos celulares con tampón PBNB (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20) de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente [32]. Para eliminar el ARN residual de la preparación de ADN, se agregó RNasa (100 µg / 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. La PCR se realizó 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 min; finalmente, 72 °C durante 5 min y 12 °C durante 5 min. Los productos de PCR se ejecutaron con gel de agarosa al 1,4% (p/v). Se cortaron las bandas correspondientes a los amplicones del tamaño esperado (444 pb) y se extrajo ADN utilizando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, 28104, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia del amplicón de ADN fue verificada por secuenciación de Sanger (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania).

Estadística

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba *t* de Student de dos colas y ANOVA. Los datos se expresan como la media ± SEM o ± DE. 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 Biorecursos de Investigación (JCRB).

3. Resultados

3.1. BNT162b2 entra en células Huh7 de la línea celular hepática humana con alta eficiencia

Para determinar si BNT162b2 entra en las células hepáticas humanas, expusimos la línea celular hepática humana Huh7 a BNT162b2. En un estudio previo sobre la cinética de captación de la administración de LNP en células Huh7, la eficacia biológica máxima de LNP se observó entre 4-7 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 6, 24 y 48 h. Se extrajo 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 el 5' -UTR de un gen de α -globina humana; la longitud completa de la proteína SARS-CoV-2 S con dos mutaciones de prolina; 3' -UTR que incorpora el segmento mitocondrial 12S rRNA humano (mtRNR1) y el segmento del gen AES/TLE5 humano con dos C \rightarrow Mutaciones U; cola 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 un solo nucleótido (nt) de desajuste en 19-26 nts (Tabla S1, ver Materiales suplementarios). Para detectar el nivel de ARN de BNT162b2, diseñamos cebadores con cebador directo ubicados en regiones de proteína SARS-CoV-2 S y cebador inverso en 3' -UTR, lo que permite la detección de amplicón de PCR exclusivo de BNT162b2 sin unión inespecífica de los cebadores a regiones genómicas humanas.

BNT162b2 sequence (4284 bases)

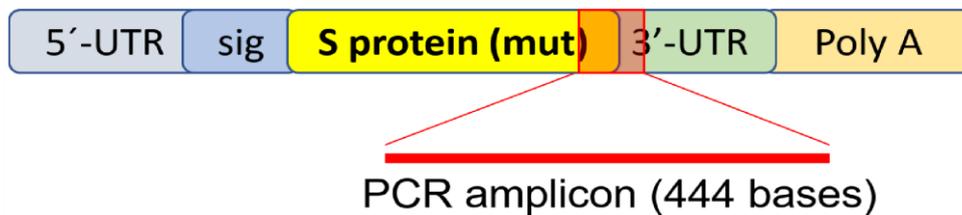


Figura 1. Conjunto de cebadores de PCR utilizado para detectar el nivel de ARNm y la transcripción inversa de BNT162b2. La ilustración de BNT162b2 se adaptó de la literatura previamente descrita [34].

Los resultados de RT-qPCR mostraron que las células Huh7 tratadas con BNT162b2 tenían altos niveles de ARNm de BNT162b2 en relación con los genes de mantenimiento a las 6, 24 y 48 h (Figura 2, presentada en $\log_2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ debido a niveles excepcionalmente altos). Las tres concentraciones de BNT162b2 condujeron a niveles intracelulares similares de ARNm de BNT162b2 en los diferentes puntos temporales, excepto que la diferencia significativa entre 1,0 y 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se observó a las 48 h. Los niveles de ARNm de BNT162b2 disminuyeron significativamente a las 24 h en comparación con 6 h, pero aumentaron de nuevo a las 48 h.

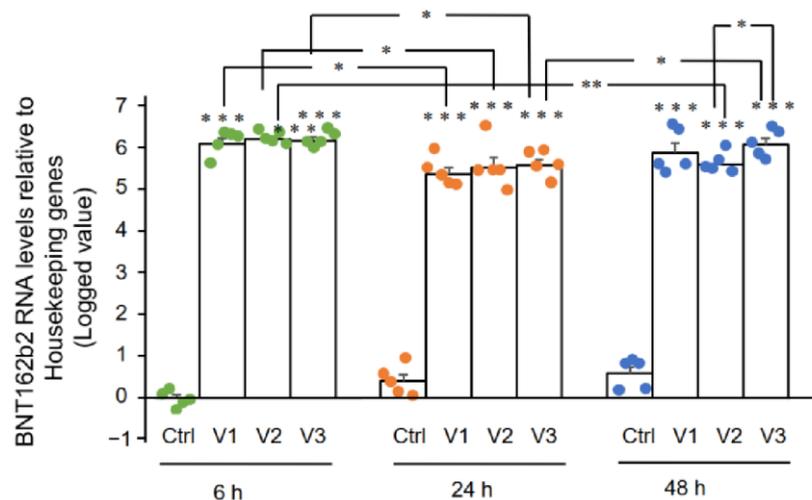


Figura 2. Niveles de ARNm de BNT162b2 en células Huh7 tratadas con BNT162b2. Las células Huh7 se trataron sin (Ctrl) o con 0,5 (V1), 1 (V2) y 2 $\mu\text{g/ml}$ (V3) de BNT162b2 durante 6 (puntos verdes), 24 (puntos naranjas) y 48 h (puntos azules). El ARN se purificó y la qPCR se realizó utilizando cebadores dirigidos a BNT162b2. Los niveles de ARN de BNT162b2 se presentan como valores logarítmicos de $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ en relación con los genes de mantenimiento doméstico *GAPDH* y *ACTB*. Los resultados provienen de cinco experimentos independientes ($n = 5$). Las diferencias entre los respectivos grupos se analizaron mediante 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 como se indica).

3.2. Efecto de BNT162b2 sobre el elemento nuclear 1 intercalado largo con transcriptasa 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 $\mu\text{g/ml}$) 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 por 2,0 $\mu\text{g/ml}$ de BNT162b2, mientras que las concentraciones más bajas de BNT162b2 disminuyeron la expresión de *LINE-1* en todos los puntos temporales (Figura 3).

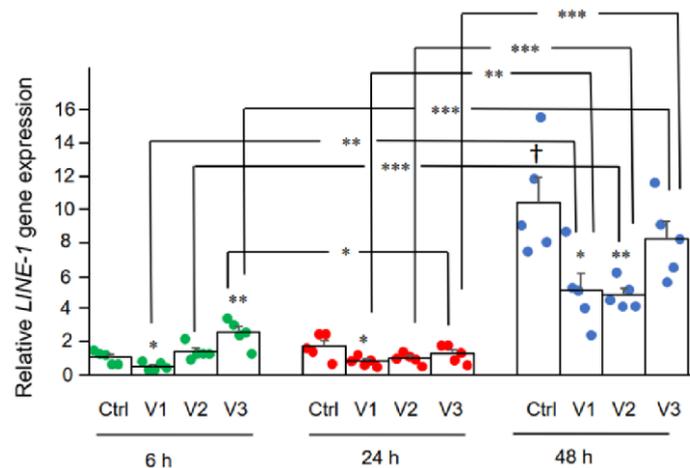


Figura 3. Niveles de ARNm de *LINE-1* en células Huh7 tratadas con BNT162b2. Las células Huh7 se trataron sin (Ctrl) o con 0,5 (V1), 1 (V2) y 2 $\mu\text{g/ml}$ (V3) de BNT162b2 durante 6 (puntos verdes), 24 (puntos rojos) y 48 h (puntos azules). El ARN se purificó y la qPCR se realizó utilizando cebadores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

A continuación, estudiamos el efecto de BNT162b2 en el nivel de proteína *LINE-1*. La *LINE-1* de longitud completa consiste en una región no traducida 5' (UTR), dos marcos de lectura abiertos (ORF), ORF1 y ORF2, y un UTR 3', de los cuales 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]. Células Huh7 tratadas con o sin BNT162b2 (0,5, 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/ml}$) durante 6 h se fijaron y se tiñeron con anticuerpos que se unen a *LINE-1* ORF1p, y la sonda específica de ADN Hoechst para la visualización del núcleo celular (Figura 4a). La cuantificación de la intensidad de tinción de inmunofluorescencia mostró que BNT162b2 aumentó los niveles de proteína *LINE-1* ORF1p tanto en toda el área celular como en el núcleo en todas las concentraciones probadas (Figura 4b-d).

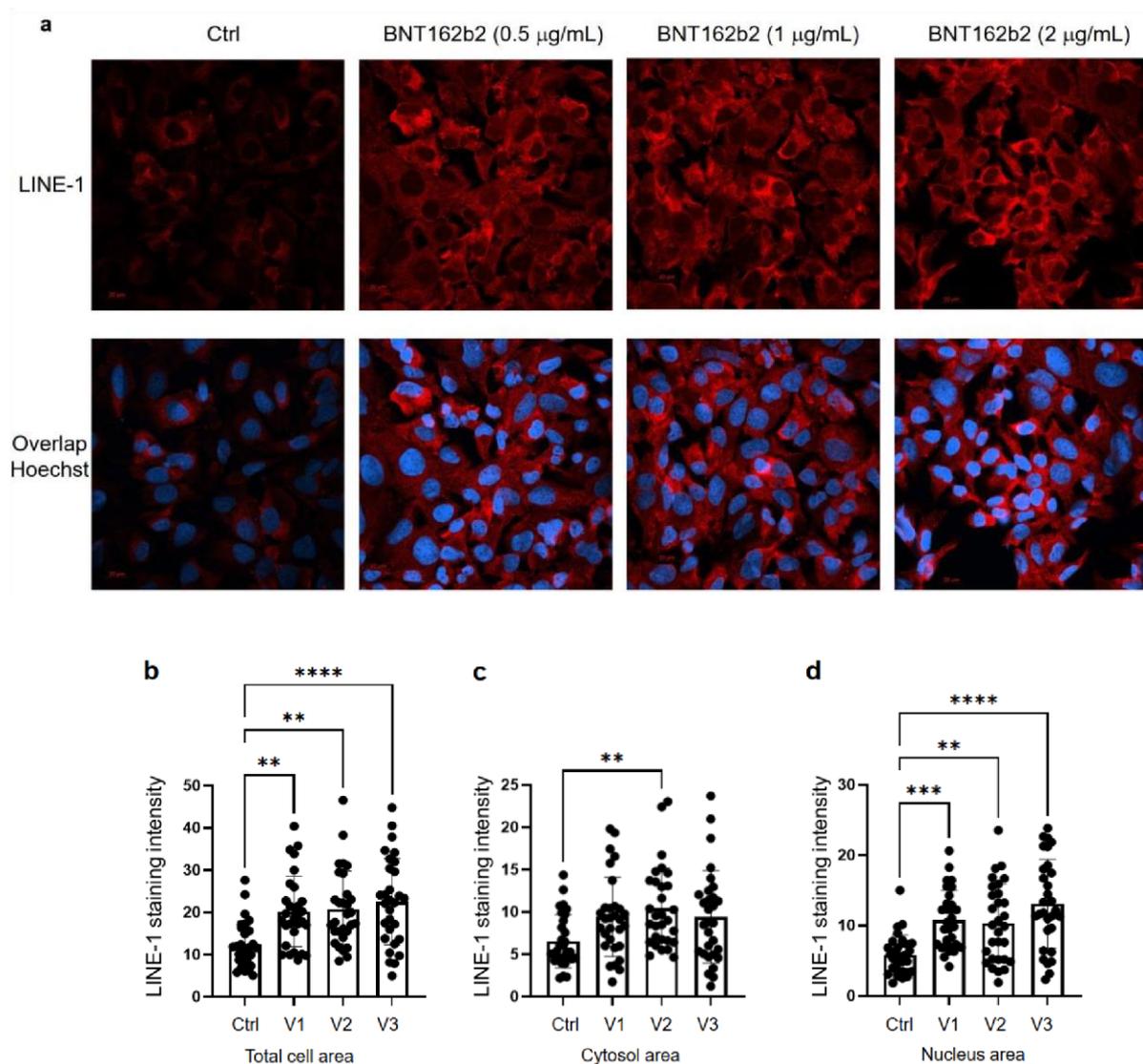


Figura 4. Inmunohistoquímica de células Huh7 tratadas con BNT162b2 en la distribución de la proteína LINE-1. Las células Huh7 se trataron sin (Ctrl) o con 0,5, 1 y 2 µg/ml de BNT162b2 durante 6 h. Las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos que se unen a LINE-1 ORF1p (rojo) y la sonda específica de ADN Hoechst 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 utilizando ANOVA unidireccional y los gráficos se crearon utilizando GraphPad Prism V 9.2. Todos los datos se presentan como media \pm DE (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ como se indica).

3.3. Detección de ADN BNT162b2 transcrito inversamente en células Huh7

Un estudio previo ha demostrado que la entrada de la proteína LINE-1 en el núcleo se asocia con la retrotransposición [35]. En el experimento de tinción de inmunofluorescencia descrito anteriormente, ya se observaron niveles elevados 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 el 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. 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 temporales (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 asegurar que los amplicones de ADN se derivaron del ADN pero no del ARN BNT162b2, también realizamos PCR en ARN purificado de

células Huh7 tratadas con 0,5 µg/mL 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.

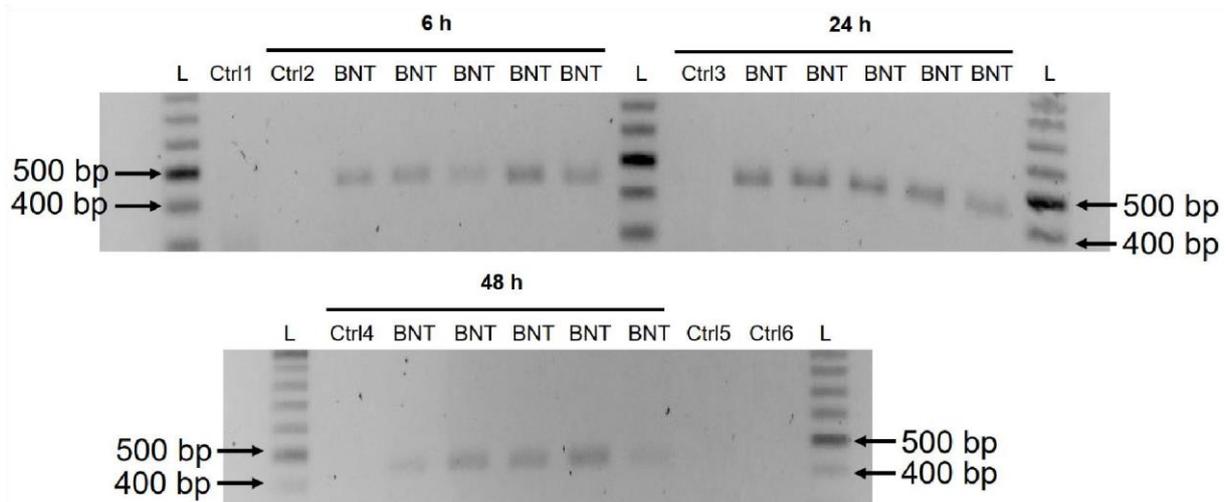


Figura 5. Detección de amplicones de ADN de BNT162b2 en células Huh7 tratadas con BNT162b2. Las células Huh7 se trataron sin (Ctrl) o con 0,5 µg/ml de BNT162b2 durante 6, 24 y 48 h. El ADN genómico fue purificado y digerido con 100 µg/mL de RNasa. La PCR se ejecutó en todas las muestras con cebadores 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 recogidas a las 6 h; Ctrl3: células Huh7 sin tratamiento con BNT162b2 recogidas a las 24 h; Ctrl4: células Huh7 sin tratamiento con BNT162b2 recogidas a las 48 h; Ctrl5: ARN de células Huh7 tratadas con 0,5 µg/ml de BNT162b2 durante 6 h; Ctrl6: ARN de células Huh7 tratadas con 0,5 µg/mL de BNT162b2 durante 6 h, digerido con RNasa.

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

```
CGAGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGCCTGATCGACCTGCAAGAAGTGGGAAGT
ACGAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGGTACATCTGGCTGGGCTTATCGCCGACTGATTG
CCATCGTATGGTCAACATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGG
GCTGTTGTAGCTGTGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGTGA
AGGGCGTGAAACTGCACTACACATGATGACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTA
GCTGCCCTTTCCCGTCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGC
TCCCACCTCCACCTGCCCACTCACCTCTGCTAGTTCAGACACCTCCAAGCAAGCACGC
AGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTA
```

4. Discusión

En este estudio presentamos evidencia de que la vacuna de ARNm COVID-19 BNT162b2 es capaz de ingresar a la línea celular hepática humana Huh7 in vitro. El ARNm de BNT162b2 se transcribe inversamente 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 proteínas del núcleo de LINE-1 está elevada por BNT162b2.

La acumulación intracelular de LNP en hepatocitos se ha demostrado in vivo [36]. Un estudio preclínico sobre BNT162b2 mostró que BNT162b2 ingresa a la línea celular humana HEK293T y conduce a una expresión robusta del antígeno BNT162b2 [37]. Por lo tanto, en este estudio, primero investigamos la entrada de BNT162b2 en la línea celular hepática humana Huh7 células. La elección de las concentraciones de BNT162b2 utilizadas en este estudio merece una explicación. BNT162b2 se administra como 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 lugar de la inyección sea más alta de 100 µg / ml [31]. Un estudio previo sobre vacunas de ARNm contra los virus de la influenza H10N8 y H7N9 que utilizan un sistema de administración de LNP similar mostró que la vacuna de ARNm puede distribuirse de manera bastante no específica a

varios órganos como el hígado, el bazo, el corazón, el riñón, el pulmón y el cerebro, y la concentración en el hígado es aproximadamente 100 veces menor que la del sitio de inyección intramuscular [38]. En el informe de evaluación sobre BNT162b2 proporcionado a la 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 al hígado [26]. Por lo tanto, elegimos usar 0.5, 1 y 2 µg / ml de vacuna en nuestros experimentos con las 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, que podría potencialmente hacer que las células hepáticas sean objetivos de células T citotóxicas reactivas de proteína de pico previamente preparadas. Ha habido informes de casos en personas que desarrollaron hepatitis autoinmunitaria [39] después de la vacunación contra 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 BNT162b2, no se han proporcionado estudios de genotoxicidad ni carcinogenicidad [26]. Nuestro estudio muestra que BNT162b2 puede transcribirse inversamente al ADN en la línea celular hepática Huh7, y esto puede dar lugar a la preocupación si el ADN derivado de BNT162b2 puede integrarse en el genoma del huésped y afectar la integridad del ADN genómico, lo que potencialmente puede mediar los efectos secundarios genotóxicos. En esta etapa, no sabemos si el ADN transcrito inversamente de BNT162b2 está integrado 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 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 restante 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, elementos nucleótidos cortos intercalados (SINE), repeticiones de número variable de tándem (VNTR), así como 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 la LINE-1 endógena 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 endógena a menudo aumenta tras la infección viral, incluida la infección por SARS-CoV-2 [45-47]. Estudios previos mostraron 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 con retrovirus exógenos [54,55], lo que promueve la entrada de LINE-1 en el núcleo. En nuestro estudio, observamos un aumento de la distribución 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 la expresión elevada del gen *LINE-1* se detectó a 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 traslacional de la proteína implica el reclutamiento de ribosomas en el codón de iniciación, la modulación del alargamiento del péptido, la terminación de la síntesis de proteínas o la biogénesis de 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 un estudio más profundo.

El modelo celular que utilizamos en este estudio es una línea celular de carcinoma, con replicación activa del ADN que difiere de las células somáticas que no se dividen. También se ha demostrado que las células Huh7 muestran una expresión significativa de genes y proteínas diferentes, incluidas las 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, por lo que es necesario examinar el efecto de BNT162b2 sobre la integridad genómica en tales condiciones. Además, también se ha informado de una retrotransposición efectiva de LINE-1 en células no divisorias y terminalmente diferenciadas, como las neuronas humanas [57,58].

El informe de evaluación de Pfizer EMA también mostró que BNT162b2 se distribuye en el bazo (<1.1%), glándulas suprarrenales (<0.1%), así como 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 inyección, induce cambios en el gen LINE-1 y la expresión de proteínas, y dentro de las 6 h, se puede detectar la transcripción inversa de BNT162b2. 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 COVID-19 BNT162b2 en la línea celular del hígado humano. Presentamos evidencia sobre la entrada rápida de BNT162b2 en las células y la posterior transcripción inversa intracelular del ARNm de BNT162b2 en el ADN.

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

Contribuciones de los autores: M.A., F.O.F., D.Y., M.B. y C.L. realizaron experimentos *in vitro*. M.A. y F.O.F. realizaron análisis de datos. M.R. y Y.D.M. contribuyeron a la implementación de la investigación, diseñaron y supervisaron el estudio. Y.D.M. escribió el artículo con el aporte de todos los autores. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

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

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

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener ningún 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, M.J.; Lyke, K.E.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Neuzil, K.; Raabe, V.; Bailey, R.; Swanson, K.A.; et al. Estudio de fase I/II de la vacuna de ARN COVID-19 BNT162b1 en adultos. *Nature* **2020**, *586*, 589–593. [CrossRef] [PubMed]
3. Walsh, E.E.; Frenck, R.W., Jr.; Falsey, A.R.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Neuzil, K.; Mulligan, M.J.; Bailey, R.; et al. Seguridad e inmunogenicidad de dos candidatos a vacuna COVID-19 basada en ARN. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2439–2450. [CrossRef] [PubMed]
4. Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Pérez, J.L.; Pérez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Seguridad y eficacia de la vacuna BNT162b2 ARNm COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2603–2615. [CrossRef] [PubMed]
5. Harris, R.J.; Hall, J.A.; Zaidi, A.; Andrews, Nueva Jersey; Dunbar, J.K.; Dabrera, G. Efecto de la vacunación en la transmisión doméstica del SARS-CoV-2 en Inglaterra. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 759–760. [CrossRef]
6. Butt, A.A.; Omer, S.B.; Yan, P.; Shaikh, O.S.; Mayr, F.B. Efectividad de la vacuna SARS-CoV-2 en una población nacional de alto riesgo en un entorno del mundo real. *Ann. Pasante Med.* **2021**, *174*, 1404–1408. [CrossRef]
7. Dagan, N.; Barda, N.; Kepten, E.; Miron, O.; Perchik, S.; Katz, M.A.; Hernán, M.A.; Lipsitch, M.; Reis, B.; Balicer, R.D. BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 1412–1423. [CrossRef]

8. Rossman, H.; Shilo, S.; Meir, T.; Gorfine, M.; Shalit, Estados Unidos; Segal, E. Dinámica de COVID-19 después de un programa nacional de inmunización en Israel. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1055–1061. [CrossRef]
9. Fan, B.E.; Shen, J.Y.; Lim, X.R.; Tu, T.M.; Chang, C.C.R.; Khin, H.S.W.; Koh, J.S.; Rao, J.P.; Lau, S.L.; Tan, G.B.; et al. Trombosis venosa cerebral post BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 vaccination: A black swan event. *Am. J. Hematol.* **2021**, *96*, E357–E361. [CrossRef]
10. Larson, K.F.; Ammirati, E.; Adler, E.D.; Cooper, L.T., Jr.; Hong, K.N.; Saponara, G.; Couri, D.; Cereda, A.; Procopio, A.; Cavalotti, C.; et al. Myocarditis After BNT162b2 and mRNA-1273 Vaccination. *Circulación* **2021**, *144*, 506–508. [CrossRef]
11. Menni, C.; Klaser, K.; Mayo, A.; Polidori, L.; Capdevila, J.; Louca, P.; Sudre, C.H.; Nguyen, L.H.; Drew, D.A.; 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. *Lancet Infect. Dis.* **2021**, *21*, 939–949. [CrossRef]
12. Hansen, T.; Titze, Estados Unidos; Kulamadayil-Heidenreich, N.S.A.; Glombitza, S.; Tebbe, J.J.; Rocken, C.; Schulz, B.; Weise, M.; Wilkens, L. Primer caso de estudio postmortem en un paciente vacunado contra el SARS-CoV-2. *Int. J. Infect. Dis.* **2021**, págs. 107, 172–175. [CrossRef] [PubMed]
13. Kadali, R.A.K.; Janagama, R.; Peruru, S.; Malayala, S.V. Efectos secundarios de la vacuna BNT162b2 mRNA COVID-19: un estudio aleatorizado y transversal con síntomas detallados autoinformados por trabajadores de la salud. *Int. J. Infect. Dis.* **2021**, *106*, 376–381. [CrossRef] [PubMed]
14. Parkash, O.; Sharko, A.; Farooqi, A.; Ying, G.W.; Sura, P. Pancreatitis aguda: un posible efecto secundario de la vacuna COVID-19. *Cureus* **2021**, *13*, e14741. [CrossRef] [PubMed]
15. Mazzatenta, C.; Piccolo, V.; Pace, G.; Romano, I.; Argenziano, G.; Bassi, A. Lesiones purpúricas en los párpados desarrolladas después de la vacuna BNT162b2 mRNA COVID-19: ¿Otra pieza del rompecabezas de la piel del SARS-CoV-2? *J. Eur. Acad. Dermatol. Venérol.* **2021**, *35*, E543–E545. [CrossRef]
16. Lee, E.J.; Cines, D.B.; Gernsheimer, T.; Kessler, C.; Michel, M.; Tarantino, M.D.; Semple, J.W.; Arnold, D.M.; Godeau, B.; Lambert, M.P.; et al. Trombocitopenia después de la vacunación contra el SARS-CoV-2 de Pfizer y Moderna. *Am. J. Hematol.* **2021**, *96*, 534–537. [CrossRef]
17. Ishay, Y.; Kenig, A.; Tsemach-Toren, T.; Amer, R.; Rubin, L.; Hershkovitz, Y.; Kharouf, F. Fenómenos autoinmunes después de la vacunación contra el SARS-CoV-2. *Inmunofarmacol Internacional.* **2021**, *99*, 107970. [CrossRef]
18. Das, B.B.; Kohli, Estados Unidos; Ramachandran, P.; Nguyen, H.H.; Greil, G.; Hussain, T.; Tandon, A.; Kane, C.; Avula, S.; Duru, C.; et al. Miopericarditis después de la vacunación COVID-19 de ARNm en adolescentes de 12 a 18 años de edad. *J. Pediatr.* **2021**, *238*, 26–32.e1. [CrossRef]
19. McLaurin-Jiang, S.; Garner, C.D.; Krutsch, K.; Hale, T.W. Síntomas maternos e infantiles después de la vacunación COVID-19 entre madres lactantes. *Amamantar.* **2021**, págs. 16, 702–709. [CrossRef]
20. Barda, N.; Dagan, N.; Ben-Shlomo, Y.; Kepten, E.; Waxman, J.; Ohana, R.; Hernán, M.A.; Lipsitch, M.; Kohane, I.; Netzer, D.; et al. Seguridad de la vacuna BNT162b2 mRNA Covid-19 en un entorno nacional. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1078–1090. [CrossRef] 21. Baden, L.R.; El Sahly, H.M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S.A.; Rouphael, N.; Creech, C.B.; et al. Eficacia y seguridad de la vacuna ARNm-1273 contra el SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* **2021**, págs. 384, 403–416. [CrossRef]
22. Sadoff, J.; Gris, G.; Vandebosch, A.; Cárdenas, V.; Shukarev, G.; Grinsztejn, B.; Goepfert, P.A.; Truyers, C.; Fennema, H.; Spiessens, B.; et al. Seguridad y eficacia de la vacuna de dosis única Ad26.COVS.2 contra Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 2187–2201. [CrossRef] [PubMed]
23. Eichinger, S.; Warkentin, T.E.; Greinacher, A. Trombocitopenia trombótica después de la vacunación ChAdOx1 nCoV-19. Respuesta. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, e11. [CrossRef] [PubMed]
24. Doroftei, B.; Ciobica, A.; Ilie, O.D.; Maftei, R.; Ilea, C. Mini-revisión discutiendo la confiabilidad y eficiencia de las vacunas COVID-19. *Diagnóstico* **2021**, *11*, 579. [CrossRef]
25. Zhang, L.; Richards, A.; Barrasa, M.I.; Hughes, S.H.; Young, R.A.; Jaenisch, R. El ARN del SARS-CoV-2 transcrito inversamente puede integrarse en el genoma de células humanas cultivadas y puede expresarse en tejidos derivados de pacientes. *USA* **2021**, *118*, e2105968118. [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.; Inoue, T.; Tamagawa, S.; Nakai, Y.; Tange, K.; Yoshioka, H.; Maeki, M.; et al. Entrega de oligonucleótidos utilizando un material lipídico autodegradable. *Farmacia* **2021**, *13*, 544. [CrossRef]
28. Sedic, M.; Senn, J.J.; Lynn, A.; Laska, M.; Smith, M.; Platz, S.J.; Bolen, J.; Hoge, S.; Bulychev, A.; Jacquinet, E.; et al. Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague-Dawley Rat and Cynomolgus Monkey. *Veterinario. Pathol.* **2018**, págs. 55, 341–354. [CrossRef]
29. Sato, Y.; Matsui, H.; Yamamoto, N.; Sato, R.; Munakata, T.; Kohara, M.; Harashima, H. La administración altamente específica de siRNA a los hepatocitos evita la toxicidad asociada a nanopartículas lipídicas mediada por células endoteliales que conduce a la disminución segura y eficaz del virus de la hepatitis B. *J. Control. Versión* **2017**, *266*, 216–225. [CrossRef]

30. Heidel, J.D.; Yu, Z.; Liu, J.Y.; Rele, S.M.; Liang, Y.; Zeidan, R.K.; Kornbrust, D.J.; Davis, M.E. Administración en primates no humanos de dosis intravenosas crecientes de nanopartículas dirigidas que contienen ribonucleótido reductasa subunidad M2 siRNA. *USA* **2007**, *104*, 5715–5721. [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, M.J.; Liu, K.; Idstrom, A.; Barriga, H.M.; Tabaei, S.; Aliakbarinodehi, N.; Ojansivu, M.; Lubart, Q.; Douth, J.J.; et al. La evolución temporal de la excreción de PEG y la coronación de proteínas séricas determina la cinética de captación celular y la entrega de nanopartículas lipídicas. *bioRxiv* **2021**. [CrossRef]
34. ARN mensajero de la Organización Mundial de la Salud que codifica la glicoproteína de pico del 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, D.J.; Badri, S.; LaCava, J.; Ueberheide, B.; Yun, C.Y.; et al. LINE-1 protein localization and functional dynamics during the cell cycle (localización de proteínas LINE-1 y dinámica funcional durante el ciclo celular). *Elife* **2018**, *7*, e30058. [CrossRef]
36. Sato, Y.; Kinami, Y.; Hashiba, K.; Harashima, H. Cinética diferente para la captación hepática de nanopartículas lipídicas entre la apolipoproteína E / receptor de lipoproteína de baja densidad y la vía del receptor N-acetil-d-galactosamina / asialoglicoproteína. *J. Control. Versión* **2020**, *322*, 217–226. [CrossRef]
37. Vogel, A.B.; Kanevsky, I.; Che, Y.; Swanson, K.A.; Muik, A.; Vormehr, M.; Kranz, L.M.; Walzer, K.C.; Hein, S.; Guler, A.; et al. Las vacunas BNT162b protegen a los macacos rhesus del SARS-CoV-2. *Nature* **2021**, *592*, 283–289. [CrossRef] [PubMed]
38. Bahl, K.; Senn, J.J.; Yuzhakov, O.; Bulychev, A.; Brito, Los Ángeles; Hassett, K.J.; Laska, M.E.; Smith, M.; Almarsson, O.; Thompson, J.; et al. Demostración preclínica y clínica de inmunogenicidad mediante vacunas de ARNm contra los virus de la influenza H10N8 y H7N9. *Mol.* **2017**, *25*, 1316–1327. [CrossRef] [PubMed]
39. Bril, F.; Al Diffalha, S.; Decano, M.; Fettig, D.M. Hepatitis autoinmune que se desarrolla después de la vacuna contra la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19): ¿causalidad o accidente? *J. Hepatol.* **2021**, págs. 75, 222–224. [CrossRef]
40. Kazazian, H.H., Jr.; Moran, J.V. ADN móvil en salud y enfermedad. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 361–370. [CrossRef] [PubMed]
41. Ataúd, J.M.; Fan, H. El descubrimiento de la transcriptasa inversa. *Annu. Rev. Virol.* **2016**, *3*, 29–51. [CrossRef]
42. Lander, E.S.; Linton, L.M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M.C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; et al. Secuenciación inicial y análisis del genoma humano. *Nature* **2001**, *409*, 860–921. [CrossRef]
43. Ostertag, E.M.; Goodier, J.L.; Zhang, Y.; Kazazian, H.H., Jr. Los elementos SVA son retrotransposones no autónomos que causan enfermedades en humanos. *Am. J. Hum. Jinet.* **2003**, *73*, 1444–1451. [CrossRef]
44. Hancks, D.C.; Kazazian, H.H., Jr. Retrotransposones humanos activos: Variación y enfermedad. *Curr. Opin. Jinet. Dev.* **2012**, *22*, 191–203. [CrossRef]
45. Jones, R.B.; Canción, H.; Xu, Y.; Garrison, K.E.; Buzdin, A.A.; Anwar, N.; Hunter, D.V.; 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. [CrossRef]
46. Macchietto, M.G.; Langlois, R.A.; Shen, S.S. Regulación positiva de la expresión de elementos transponibles inducida por virus en células huésped humanas y de ratón. *Life Sci. Alliance* **2020**, *3*, e201900536. [CrossRef] [PubMed]
47. Yin, Y.; Liu, X.Z.; Él, X.; Zhou, L.Q. El coronavirus exógeno interactúa con el retrotransposón endógeno en células humanas. *Frente. Infección celular. Microbiol.* **2021**, *11*, 609160. [CrossRef] [PubMed]
48. Belancio, V.P.; Roy-Engel, A.M.; Deininger, P. El impacto de múltiples sitios de empalme en elementos L1 humanos. *Gene* **2008**, *411*, 38–45. [CrossRef] [PubMed]
49. Dai, L.; Taylor, M.S.; O'Donnell, K.A.; Boeke, J.D. La proteína de unión a poli (A) C1 es esencial para la retrotransposición eficiente de L1 y afecta la formación de L1 RNP. *Mol. Cell Biol.* **2012**, *32*, 4323–4336. [CrossRef]
50. Sirviente, G.; Strevia, V.A.; Derbes, R.S.; Wijetunge, M.I.; Neeland, M.; Blanco, T.B.; Belancio, V.P.; Roy-Engel, A.M.; Deininger, P.L. La vía de reparación por escisión de nucleótidos limita la retrotransposición de L1. *Genética* **2017**, *205*, 139–153. [CrossRef]
51. Guo, H.; Chitiprolu, M.; Gagnon, D.; Meng, L.; Pérez-Iratxeta, C.; Lagace, D.; Gibbings, D. La autofagia apoya la estabilidad genómica mediante la degradación del ARN retrotransposón. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5276. [CrossRef]
52. Xie, Y.; Compañeros, L.; Ivics, Z.; Izsvak, Z.; Martín, S.L.; An, W. La división celular promueve la retrotransposición eficiente en una línea celular reportera L1 estable. *Chusma. ADN* **2013**, *4*, 10. [CrossRef]
53. Shi, X.; Seluanov, A.; Gorbunova, V. Las divisiones celulares son necesarias para la retrotransposición de L1. *Mol. Cell Biol.* **2007**, *27*, 1264–1270. [CrossRef]
54. Goff, S.P. Factores del huésped explotados por retrovirus. *Microbiol* **2007**, *5*, 253–263. [CrossRef]
55. Suzuki, Y.; Craigie, R. El camino hacia la cromatina: entrada nuclear de retrovirus. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 187–196. [CrossRef]

-
56. Shi, J.; Wang, X.; Lyu, L.; Jiang, H.; Zhu, H.J. Comparación de la expresión de proteínas entre hígados humanos y las líneas celulares hepáticas HepG2, Hep3B y Huh7 utilizando la proteómica SWATH y MRM-HR: centrándose en las enzimas metabolizadoras de fármacos. *Medicamento Metab. Farmacoquineta*. **2018**, págs. 33, 133–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 57. Kubo, S.; Seleme, M.C.; Soifer, H.S.; Pérez, J.L.; Moran, J.V.; Kazazian, H.H., Jr.; Kasahara, N. L1 retrotransposición en células somáticas humanas primarias y no divisorias. *USA* **2006**, *103*, 8036–8041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 58. Macia, A.; Widmann, T.J.; Heras, S.R.; 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 no divididas. *Genoma Res.* **2017**, págs. 27, 335–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]