

ARNm, partículas nanolipídicas y PEG: Una triada nunca usada en vacunas clínicas va a ser testada en cientos de millones de personas

Dr. Alejandro Sousa. Urologo Hospital Comarcal de Monforte. Universidad de Santiago de Compostela

Prof. María José Martínez-Albarracín. Catedrática Jubilada de Procesos Diagnósticos Clínicos. Murcia

Abstract

Las “*pseudo-vacunas*” de Moderna y Pfizer-BioNTech para COVID-19 contienen mRNA envuelto por nanopartículas lipídicas (LNP) y polietilenglicol (PEG). Ninguno de estos 3 componentes ha sido aprobado para vacunas o medicamentos. Moderna abandonó su uso en 2017 por una alta tasa de efectos adversos. Diversas investigaciones han demostrado que los LNP ingresan fácilmente al cerebro y pueden desencadenar reacciones inmunes sobre todo tras la segunda dosis. Mas de 70% de la población americana es alérgica al PEG, por lo que estas vacunas pueden causar reacciones alérgicas y anafilaxia. Finalmente, existen sospechas fundadas de que, estas vacunas pueden causar esterilidad e insertarse en nuestro DNA, causando mutaciones cuya repercusión se desconoce y que incluso podrían ser transmitidas a nuestra descendencia.

Introducción

La OMS alertó en diciembre de 2019 de la aparición en Wuhan (China) de un brote de una enfermedad respiratoria pulmonar altamente contagiosa. Se concluyó que su origen era debido a un nuevo Betacoronavirus que fue nombrado como SARS-CoV2 y la enfermedad que producía como Covid-19 (1,2). Poco después la OMS declaró una pandemia mundial y más de doscientas empresas y centros universitarios empezaron una carrera de obstáculos para conseguir desarrollar una vacuna en un tiempo record.

Se afirma que la creación de vacunas basadas en mRNA son la forma idónea de avanzar rápidamente en su desarrollo, en la realización de ensayos clínicos y en la producción en masa de las mismas. Todo ello debido a la simplicidad de su transcripción in vitro y el enorme potencial de fabricación escalable y a bajo costo (3,4)

Históricamente, el desarrollo de una vacuna tarda entre 5 y 25 años hasta su comercialización y en algunos casos como el HIV no se han logrado fabricar después de 35 años. En este caso, la empresa Moderna (Cambridge–USA) consiguió empezar los ensayos clínicos fase I apenas 63 días después de iniciar su investigación (5) lo que ha hecho dudar a muchos si se trata de un importante logro científico o de una irresponsabilidad mayúscula.

Aunque los representantes científicos de las empresas farmacéuticas afirman de manera rotunda que estas vacunas lograrán una inmunidad en mas del 90% de la población vacunada y que los efectos secundarios serán leves, muchos científicos independientes opinan que apenas superara el 40%. (6,7). De momento, nada se sabe sobre la duración de la inmunidad producida, si induce o no inmunidad celular y si puede generar efectos secundarios tardíos de tipo autoinmune.

Sin embargo, el tema mas polémico sobre las vacunas mRNA es sobre si dicho material genético puede o no mezclarse con nuestro ADN de forma permanente con las posibles complicaciones que este hecho pueda producir. Las empresas fabricantes de este tipo de vacunas afirman que, después de la traducción, el mRNA sintético será degradado por las enzimas del huésped y no interactuará con el genoma del huésped.

En el presente artículo mostraremos que esa afirmación puede resultar incorrecta y que aplicar una vacuna sin total garantía de que no va a modificar nuestro propio código genético es un claro error. Aplicarlo a miles de millones de personas una absoluta temeridad.

Esto no son realmente vacunas ni se han utilizado nunca antes en humanos

En febrero de 2015, un equipo de científicos anunció del Instituto de Investigación Scripps dijeron que habían desarrollado un “anticuerpo artificial” que, teóricamente, podía eliminar el SIV, una versión del HIV en primates, de los monos infectados y protegerlos de futuras infecciones. Pero, este tratamiento no es una vacuna, se le conoce como inmunoprofilaxis por transferencia de genes (IGT). Se trata de una forma de terapia génica completamente diferente de la vacunación tradicional (8).

Las vacunas de ARNm enseñan a las células a producir una proteína, o un fragmento de proteína, que desencadena una respuesta inmunitaria, incluida la producción de anticuerpos (3). Dado que el ARNm natural se descompone fácilmente se necesita vehiculizarlo para llegar a las células del cuerpo y traspasar fácilmente sus membranas. Para lograrlo, Moderna y Pfizer-BioNTech utilizan LNP que están "PEGilados", es decir, unidos químicamente a las moléculas de PEG para aumentar la estabilidad y evitar su metabolización (5,9,10).

Esta terapia experimental IGT y su sistema de administración basado en LNP + PEG nunca han sido aprobados para su uso en una vacuna o fármaco (11). Incluso estas 2 vacunas solo fueron "*autorizadas para uso de emergencia*" por la FDA de los estados unidos, pero "*no ha sido aprobada para uso clínico habitual*" (12,13).

Existen graves preocupaciones sobre la tecnología IGT, incluidos el mRNA y las LNP. De hecho, la compañía Moderna abandono estos tratamientos en 2017 debido a una alta tasa de efectos adversos por lo que "*no demostró ser lo suficientemente seguro para probarlo en humanos*" (14).

En 2018, la propia compañía Moderna reconoció que sus LNP conllevaban riesgos serios y que "*No se ha aprobado ningún medicamento de mRNA... y es posible que nunca se apruebe. El desarrollo de medicamentos de mRNA tiene riesgos sustanciales de desarrollo clínico y regulatorios... sin precedentes de esta nueva categoría de medicamentos*"(14,15). Por si eso fuese poco, también reconocieron que "*Las terapias génicas y los medicamentos basados en ARNm pueden activar una o más respuestas inmunitarias contra todos y cada uno de los componentes del medicamento... dando lugar a posibles eventos adversos relacionados con la reacción inmunitaria*"(14,15).

Y continúan diciendo: "*Nuestros LNP podrían contribuir, total o parcialmente, a uno o más de los siguientes: reacciones inmunes, reacciones a la infusión, complemento reacciones, reacciones de opsonación, reacciones de anticuerpos que incluyen IgA, IgM, IgE o IgG o alguna combinación de las mismas, o reacciones al PEG de algunos lípidos o PEG asociados de otro modo con el LNP*"(14). "*Así como reacciones adversas en las vías hepáticas*"(14,15).

Características atribuidas y tipos de vacunas mRNA

Teóricamente, una vez que el mRNA mensajero ha penetrado en el citoplasma de una célula del paciente vacunado este es traducido por los ribosomas fabricando la proteína diana que luego sufrirá un proceso de plegamiento post-traduccionales que permitirá la formación de una proteína tridimensional plenamente funcional (4).

Las vacunas mRNA de Moderna (mRNA-1273) y de Pfizer/BioNTech (BNT162b2) codifican la proteína de “spike” del SARS-CoV-2 encargada de unirse al receptor ACE2 responsable ultimo de la entrada del virus en las células. En los estudios preclínicos se observó que los anticuerpos fabricados tras la vacunación que se unen a la proteína “spike”, principalmente su dominio de unión al receptor, neutralizando el virus al evitar que se una al receptor ACE2 de las células diana (5,16).

Se espera que la célula vacunada producirá algunas copias de la proteína “spike” que pueden ser: 1.- presentadas en su superficie por el complejo principal de histocompatibilidad estimulando una reacción inmune o 2.- Secretadas al espacio

extracelular donde serán capturadas por las células dendríticas presentadoras de antígenos. Dichas células activarán finalmente a los linfocitos T y B inmaduros para producir anticuerpos y generar una respuesta inmune celular contra la proteína “spike” del SARS-CoV2 (5,16).

Según sus partidarios, las vacunas de mRNA son mas seguras ya que, al no utilizar virus completos atenuados o inactivados, no pueden transmitir la infección viral. Además, permite una fabricación rápida y masiva, ya que no hay necesidad de crecimiento y expansión viral o el desarrollo de cultivos celulares específicos de virus (3,4).

Existen dos tipos de vacunas de mRNA: Las autoreplicantes -también llamadas autoamplificadas- y las no replicantes. Las vacunas comercializadas por Pfizer y Moderna son de tipo no replicantes. Este es el tipo más simple y consiste en una hebra de mRNA, que se empaqueta y se inyecta en el cuerpo, que penetrará en nuestras células para producir el antígeno (proteína “spike” del SARS-CoV-2) que estimulará nuestro sistema inmunitario. (17,18)

Las vacunas mRNA autorreplicante incluyen no solo la secuencia genética del antígeno requerido, sino también la maquinaria de replicación del ARN necesaria para que el mRNA se amplifique un mayor número de veces una vez que penetre en el citoplasma celular lo que garantiza una mayor fabricación de antígeno por parte de la célula afectada. Dicho ARN autorreplicante se denominan “*Replicón*”. Este tipo de vacunas produce una mayor cantidad de antígeno que teóricamente ayuda a conseguir una mayor respuesta inmunitaria en forma de anticuerpos neutralizantes. Aunque existen vacunas mRNA replicante estas todavía no han concluido la fase de ensayos clínicos (17,18).

En ambos tipos de vacunas, el mRNA se envuelve en una cápsula protectora, como nanopartículas de lípidos, que lo protegerá de su rápida degradación mientras viaja por nuestro cuerpo y permitirá su penetración eficiente a través de la membrana celular externa. (5,10,16).

¿Podría el mRNA insertarse en nuestro ADN?

Sabemos que los retrovirus introducen su material genético de forma permanente en nuestro ADN. De hecho, el 8% de nuestro código genético es de origen viral siendo conocidos dichos como “*genes retrovirales*” (19). Se supone que, durante los millones de años de nuestra evolución, el material genético tipo ADN viral se insertó de forma permanente en nuestras células gracias a que la mutación celular resultante fue beneficiosa para nuestra especie. Sin embargo, cientos de miles de mutaciones similares producidas al azar resultaron dañinas para los individuos afectados y probablemente supusieron una grave enfermedad o la muerte de estos.

Las empresas comerciales fabricantes de vacunas mRNA, los responsables de sanidad de los gobiernos y diversas universidades aseguran con total rotundidad que dicho material genético no puede introducirse en nuestro genoma. Se basan en el concepto de *unidireccionalidad del flujo de información genética celular* para afirmar que no existe la posibilidad de mutagénesis de nuestro DNA por inserción de mRNA ya que es literalmente imposible que este ingrese al núcleo celular.

Los únicos argumentos “*probatorios*” de esa afirmación son: 1.- Imposibilidad de unión física al DNA: El mRNA, no puede pasar del citoplasma al núcleo por el efecto barrera que supone la membrana nuclear (20) y porque el mRNA se degrada de forma natural después de la traducción a proteínas en el citosol (21). 2.- Ausencia de una transcriptasa reversa (RT): Afirman que, incluso si consiguiese introducirse en el núcleo, no conseguiría convertirse en ADN e introducirse en nuestro genoma al no disponer de RT que permita dicha conversión.

Hasta la actualidad nunca se habían utilizado vacunas mRNA de forma clínica por lo que dichas afirmaciones no han sido fehacientemente probadas a nivel clínico y

muchos investigadores independientes plantean la elevada posibilidad de que dicho material genético acabe formando parte de nuestros cromosomas

1.- Mecanismos de entrada de mRNA en el núcleo

La primera de dichas afirmaciones que rechazan cualquier riesgo de mutagénesis se basa en la simplista idea de que el ADN del núcleo se transcribe de forma a mRNA que atraviesa la membrana nuclear y al llegar al citoplasma se traduce a proteínas mediante su lectura en los ribosomas. Esta perfectamente probado que el proceso $DNA \rightarrow mRNA \rightarrow Proteínas$ no es un proceso exclusivamente unidireccional y que la vía retrograda es perfectamente posible. A continuación, describiremos 4 situaciones en las que eso puede ocurrir; las dos primeras en las células en división celular y las dos siguientes en células en interfase.

1.1.- Durante la división celular

La biología elemental nos enseña que durante la división celular hay fases en las que la membrana nuclear desaparece y los cromosomas se mezclan con el citoplasma y sería perfectamente posible que dentro de la misma se incluyese citoplasma conteniendo mRNA vacunal (22).

Es cierto que los cromosomas son material genéticamente empaquetado, al que no podría unirse nuevo material genético. Sin embargo, después de las divisiones celulares, se vuelve a crear una nueva membrana nuclear y los cromosomas vuelven a una situación conformacional no compactada. Dicha descondensación de los cromosomas da origen a cromatina que representa un estado totalmente funcional de nuestro ADN. En esas condiciones, la introducción del mRNA vacunal en nuestro material genético es solo una cuestión de tiempo y probabilidades estadísticas (23,24).

1.1.1- Mitosis

Es el proceso de división celular cuyo resultado es la formación de dos células hijas con el mismo número de cromosomas. Se desarrolla a lo largo de cinco fases: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

Durante la prometafase se produce una fragmentación de la membrana nuclear en múltiples vesículas. A continuación, se forma el huso mitótico. Se trata de un conjunto de microtúbulos que surgen de los centriolos durante los procesos de división celular (*sea mitosis o meiosis*) y que van desde los centrómeros de los cromosomas hasta los centriolos situados en los polos. Es importante comprender que, dado que los centriolos están localizados fuera del núcleo, los microtúbulos del huso no pueden unirse a los centrómeros de los cromosomas hasta que la membrana nuclear se rompe.

Una vez creado el huso mitótico, las cromátidas hermanas son traccionadas en direcciones opuestas hacia ambos polos del mismo y que darán origen a los futuros cromosomas hijos. Durante la telofase los cromosomas hijos se alargan, pierden condensación y se recupera la membrana nuclear que se forma nuevamente a partir del retículo endoplásmico rugoso (25-27).

Como vemos, durante la mitosis se produce una reorganización total del material celular durante el cual, las moléculas presentes en el citoplasma celular (*proteínas, lípidos, mRNA*) pueden acabar envueltos durante la telofase dentro del nuevo núcleo celular (Fig. 1) y posteriormente unirse a nuestro DNA mediante una RT.

1.1.2.- Meiosis

Es el proceso de división celular, propio de las células reproductoras eucariotas, en el que se reduce a la mitad el número de cromosomas para crear células sexuales haploides o gametos (*óvulos y espermatozoides*) que contienen una sola copia de cada cromosoma los cuales, al unirse, formaran un cigoto con el número completo de

cromosomas. El proceso de la Meiosis toma la forma de una replicación de ADN seguida de dos divisiones nucleares y celulares sucesivas. Dichas divisiones o fases se denominan Meiosis I y Meiosis II (28).

Como en la mitosis, la meiosis I está precedida por la interfase, un proceso de replicación del ADN que convierte cada cromosoma en dos cromátidas hermanas. La meiosis I es una división celular especial en la que se separa los pares de cromosomas homólogos y se reduce su material genético pasando de una célula diploide a otra haploide. Una segunda fase de crecimiento llamada interquinesis puede ocurrir entre la meiosis I y II, sin embargo, no ocurre replicación del ADN en esta etapa. Los eventos de la Meiosis II son análogos a los de una división mitótica, aunque el número de cromosomas involucrados se ha reducido a la mitad (28).

La meiosis es un proceso básico para generar una mayor diversidad genética en los descendientes ya que los gametos de ambos progenitores aportaran la mitad de la carga genética al cigoto creado (29).

Al igual que en la prometafase de la Mitosis, durante las prometafases de la meiosis I y II, se produce una fragmentación de la membrana nuclear en múltiples vesículas. De la misma manera, durante ambas fases de la Meiosis, se produce una reorganización total del material celular durante el cual, las moléculas presentes en el citoplasma celular (proteínas, lípidos, mRNA) pueden acabar envueltos dentro del nuevo núcleo celular y por tanto unirse a nuestro DNA de la misma forma que en la mitosis (Fig. 1). Sin embargo, en este caso, las consecuencias pueden ser mas graves porque dicha mutación genética sería transmitida a nuestra descendencia (29-31).

1.2.- Durante la interfase (fuera de la división celular)

1.2.1.- Complejo de poros nucleares (NPC), señales localización nuclear (NLS) y cubiertas lipídicas

Llevamos tres décadas investigando la utilización de material genético para el tratamiento de enfermedades originadas por mutaciones puntuales de nuestro genoma como el cáncer. Entendemos por terapia génica la capacidad de modificar genes alterados (mutados) o de realizar modificaciones concretas dirigidas a obtener un resultado terapéutico determinado. Este enfoque incluye la posible modificación de genes implicados en enfermedades como la hemofilia, distrofia muscular, fibrosis quística, distintos cánceres e infecciones virales como el SIDA (32).

La introducción en nuestras células (citoplasma y núcleo) de ADN y ARN ha evolucionado de forma notoria en los últimos años. Una de las vías mas estudiadas es la introducción de mRNA en el citoplasma celular para su traducción y fabricación de aquellas proteínas funcionales que fuesen deficientes en esa enfermedad. Dicho mRNA sería digerido a continuación por enzimas específicas con lo que su vida media intracelular sería muy corta (33).

De hecho, uno de los problemas que enfrentan este tipo de terapias es que el mRNA sea destruido antes de haber alcanzado el complejo de ribosomas y ser traducido en la correspondiente secuencia proteica. Así, la cantidad de proteínas fabricadas sería muy pequeña y sin valor terapéutico. Por ese motivo, se han buscado mecanismos farmacocinéticos mas eficientes para ejercer su función como el desarrollo de nanocápsulas lipídicas que facilitasen su entrada a través de la membrana celular externa y preservase al material genético introducido de su destrucción por las enzimas citoplasmáticas.

El transporte del ADN terapéutico desde el citoplasma al núcleo es un proceso ineficaz y se considera el principal paso limitante en las células que no se dividen que afectaría incluso en mayor medida al mRNA

La unión del material genético a cubiertas lipídicas mejora sensiblemente la penetración dentro del núcleo. Dichas cubiertas promueven la entrada nuclear a través de

fusión con la envoltura nuclear (lipoplexes) o permeación de la membrana nuclear (polioplexes). De hecho, mediante reacción en cadena de la polimerasa y análisis de microscopía electrónica, se descubrió que cuando introducimos plásmidos, protegidos por lipoplexos y polioplexos, dentro del citoplasma, entre un 1 y un 10% consiguen penetrar al núcleo (34). Aunque se desconoce el mecanismo exacto se cree que las cargas eléctricas de dichas moléculas y la membrana podrían ser una explicación de este proceso.

En los últimos 20 años, se han realizado enormes esfuerzos para dilucidar los mecanismos para el tráfico nuclear y la importación nuclear de plásmidos, que son importantes para que desarrollemos estrategias eficientes para la entrega de ADN.

El NPC es un gran complejo de proteínas que forma canales (poros) en la envoltura nuclear que permite la importación y exportación de macromoléculas. Sin embargo, si estas son mayores de 9 nm requieren de un proceso mediado por NLS (35).

Una de las estrategias para mejorar la absorción nuclear de ADN o ARN sería aprovechar la maquinaria de importación nuclear celular mediante la formación de complejos entre la NLS y el material genético, DNA o RNA, que se quiere introducir en el núcleo

Los péptidos sintéticos que contienen una NLS se unen al ADN para que el complejo ADN-NLS resultante pueda reconocerse como un sustrato de importación nuclear por proteínas receptoras intracelulares específicas.

Las importinas α y β son proteínas que facilitan la translocación de diferentes cargas citoplasmáticas al núcleo. La unión del complejo de importinas a una NLS aumenta su unión al ADN, dilata los poros nucleares e incrementan la traslocación del material genético del citoplasma al núcleo (36,37).

1.2.2.- Pegilación

Para cumplir su función, las nanopartículas deben alcanzar su objetivo terapéutico, sin ser reconocidas como extrañas por el organismo y luego eliminadas. Para reducir este proceso de aclaramiento, el LNP se puede unir al PEG, una técnica conocida como "*PEGilación*". La conjugación de superficie de PEG en proteínas prolonga su tiempo de circulación sanguínea y reduce la inmunogenicidad al aumentar su tamaño hidrodinámico y enmascarar los epítomos de superficie (38).

A pesar de este éxito, un cuerpo de literatura emergente destaca la presencia de anticuerpos producidos por el sistema inmunológico que reconocen y se unen específicamente a PEG (Abs anti-PEG), incluidos los Abs preexistentes y los inducidos por el tratamiento. Más importante aún, la existencia de Abs anti-PEG se ha correlacionado con la pérdida de eficacia terapéutica y el aumento de los efectos adversos en varios informes clínicos que examinan diferentes terapias PEGiladas (39,40).

En contraste con la suposición común de que el PEG es biológicamente inerte, se han encontrado Abs anti-PEG tanto preexistentes como inducidos terapéuticamente en la población general, así como en pacientes que reciben productos terapéuticos PEGilados. La existencia de inmunidad anti-PEG ha traído complicaciones a los terapéuticos con proteínas PEGiladas, especialmente porque varios estudios clínicos han correlacionado la pérdida de eficacia y el aumento de los eventos adversos de ciertos productos terapéuticos que contienen PEG con Abs anti-PEG (41,42).

Las formulaciones terapéuticas basadas en material genético como vacunas y tratamientos antineoplásicos chocaron desde su inicio con una corta vida media circulante. Las enzimas y el sistema inmune se encargan de su eliminación de forma muy eficiente con lo que no consiguen llegar a sus células diana ni ejercer acción alguna (43,44).

Los PEG son poliéteres hidrófilos comúnmente utilizados en productos farmacéuticos, cosméticos, alimentarios y domésticos. Se han utilizado ampliamente varios pesos moleculares de PEG para numerosas aplicaciones, como soluciones de

inyección, píldoras, soluciones acuosas, desinfectantes para la piel, pastas dentales y laxantes osmóticos (46,47).

Su uso extensivo en ese tipo de productos de la vida diaria, así como su utilización en terapias de proteínas y nanopartículas, ha hecho que un número creciente de personas desarrollen anticuerpos contra el PEG lo cual ha generado dos problemas antes inexistentes: la reducción de la eficacia de las drogas PEGiladas y la aparición de reacciones alérgicas anafilácticas que en ocasiones pueden ser graves e incluso mortales...(42).

Aunque muchos anticuerpos contra sustancias farmacéuticas aparecen tras la(s) dosis inicial(es) del mismo, en el caso de los anticuerpos anti-PEG Ab estos pueden existir en personas que nunca se han sometido a un tratamiento con fármacos PEGilados pero que han estado expuestos a PEG presentes en otros tipos de productos.

El porcentaje de personas con anticuerpos anti-PEG, tanto IgG como IgM, no ha parado de crecer en los últimos años. Mientras hace unas décadas la incidencia era del 0.2% (48), dicha cifra se elevó hasta 22-25% a principio de la década pasada (40) y hasta el 72% en 2016 (41).

1.2.3- Virus HIV y lentivirus

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y otros lentivirus tienen la capacidad de infectar el núcleo de células que no se estén dividiendo como los macrófagos y otras células inmunes. La infección retroviral implica la transcripción inversa del genoma del ARN viral en ADN, que posteriormente podría integrarse en el genoma de la célula huésped (49-50).

Estos virus utilizan las proteínas de la cápside para integrarse en las vías de importación nuclear celular (Fig. 1) de la célula diana de forma que pueden translocar al núcleo a través de componentes del poro nuclear (51-53).

Durante muchos años se han buscado los factores necesarios para la importación nuclear del VIH-1. Informes recientes sugieren que TNPO3 / Transportin-SR2 se une a la integrasa del VIH-1 que resulta necesaria para la infección por VIH-1 de las células en interfase (54,55).

2.- Mecanismos de Integración en el ADN nuclear

2.1.- Integración de ADN

Yakubov et al demostraron que tras la adición de fragmentos de ADN placentario de 500bp se produjo un incremento del contenido genómico celular en un 4% por hora de incubación. De hecho, un 40-50% del ADN fragmentado agregado al cultivo celular fue absorbido por una célula y el 10-20% del ADN agregado se pasó al núcleo, lo que demuestra la efectividad con la que el ADN puede ingresar al núcleo celular (56).

El retrovirus humano endógeno K (HERVK) es un retrovirus que se integró en las células de la línea germinal humana hace relativamente poco tiempo en la evolución humana y se hereda de manera mendeliana como retrovirus endógeno.

Estos retrovirus son generalmente inactivos. Sin embargo, la evidencia reciente ha demostrado que HERVK se puede reactivar (57-60) o incluso mantener su actividad integrasa en humanos (61).

Algunas de las vacunas contra la varicela, sarampión, paperas y rubéola están contaminadas con fragmentos del retrovirus endógeno humano K (HERVK) (62,63), un retrovirus que invade el genoma de su huésped, puede ser reactivado en cualquier momento y que puede facilitar la integración ADN en el genoma del huésped.

A pesar de ser un riesgo no estudiado para los receptores de las vacunas, la literatura científica demuestra claramente la alta probabilidad de que estos contaminantes presenten peligros de mutagénesis autoinmune y/o de inserción genómica (64).

Dichos riesgos han sido siempre menospreciados. En un ensayo inicial de terapia génica, los expertos de la División de Terapia Génica de la FDA estimaron que el riesgo de mutaciones y cáncer inducidos por fragmentos de ADN retrovéricos y humanos era de 1 en un billón. Trágicamente, cuando les dieron los fragmentos de ADN retrovérico y humano a niños con enfermedad de SCID en un ensayo de terapia génica, 4 de cada 9 (44%) de los niños desarrollaron leucemia (65). La infravaloración que hicieron del riesgo debería avergonzar a los que hicieron tales predicciones.

2.1.- Integración de RNA

La utilización por los virus de sus propias RT para cambiar RNA por DNA es un hecho conocido hace décadas. Entre los más estudiados están los virus de la Inmunodeficiencia humana, de la leucemia murina Moloney, de la mieloblastosis aviar y de otros lentivirus. De hecho, antes se creía que era la única manera de que este proceso ocurriese de forma natural (66).

La RT, también conocida como ADN polimerasa dependiente de ARN, es una enzima presente en los retrovirus que recorre la cadena de mRNA y sintetiza una cadena de ADN complementario (ADNc) a partir del molde de mRNA. Además, la RT participa en la formación de una doble hélice de ADN a partir de una sola cadena de cDNA (monocatenario). En resumen, la transcripción inversa implica la síntesis de ADN a partir del ARN (67).

Sin embargo, el descubrimiento de RTs endógenas desafió el concepto de unidireccionalidad del flujo de información genética celular y confirmó que esa dirección inversa no estaba solo reservada para los retrovirus y similares (66-68).

Inicialmente se pensaba que las RTs endógenas de las células eucariotas no tenían una función específica en las células y que se originaban a partir de retrotransposones o virus. Sin embargo, en la actualidad se sabe que no es así (66).

Las telomerasas son el ejemplo de RTs endógenas más comunes dentro de ese tipo de enzimas. Además, sabemos que los genes relacionados con la RT son relativamente comunes y pueden haber desarrollado diferentes funciones mediante la adquisición de varias extensiones N- y C-terminales (67).

Se ha identificado actividad de RT endógena específica en los espermatozoides, que puede realizar la transcripción inversa de ARN exógeno directamente y generar copias de ADNc. Dichas copias pueden ser transferidas como estructuras extracromosómicas de baja copia y transmitirse a la progenie de una manera no mendeliana. Además, al ser transcripcionalmente competentes, pueden inducir variaciones fenotípicas en tejidos positivos (68).

No obstante, aun más importante es ser conscientes de que las células indiferenciadas y los embriones expresan altos niveles de RT endógena no telomerasa. De hecho, la RT endógena puede considerarse como un regulador epigenético de la transformación y proliferación celulares (69).

Aunque los razonamientos anteriores son básicamente teóricos, Zhang L et al (70) estudiaron específicamente la posibilidad de que el ARN del SARS-CoV-2 fuese transcrito de forma reversa e integrado en el genoma humano. Experimentalmente probaron que su ARN se puede transcribir de forma inversa en células humanas mediante la RT de los elementos LINE-1 o mediante la RT del VIH-1, y que estos ADN las secuencias pueden integrarse en el genoma celular y posteriormente transcribirse. La expresión de LINE-1 endógena humana se indujo tras la infección por SARS-CoV-2 o por exposición a citocinas en células cultivadas, lo que sugiere un mecanismo molecular para la reintegración del SARS-CoV-2 en pacientes. Esta nueva característica de la infección por SARS-CoV-2 puede explicar por qué los pacientes pueden continuar produciendo ARN viral después de la recuperación y podría ser una vía de entrada del mRNA de la vacuna dentro del núcleo celular.

La utilización de vacunas mRNA podría inducir alteraciones genéticas transmisibles a la descendencia a través de los espermatozoides afectados, pero sobre todo su uso en mujeres embarazadas podría producir una mutagenesis de las células en crecimiento del feto alterando la diferenciación inherente a la formación de los órganos en desarrollo (71).

Nanopartículas lipídicas + polietilenglicol + mRNA: Una combinación peligrosa?

Tal y como habíamos visto, una vacuna mRNA puede ser fácilmente destruidas por enzimas del tipo de las ribonucleasas (72) y por tanto deben ser envueltas en una capsula protectora hasta que consigan alcanzar el interior celular y en su caso penetrar dentro del compartimento nuclear. Un hecho importante a tener en cuenta es que el mRNA de la vacuna de Pfizer ha sido modificado sustituyendo el uracilo por metil pseudouracilo ya que los nucleósidos modificados existentes en la naturaleza como la pseudouridina o la 1-metil-3'-pseudouridina no inducen esa respuesta inmunogénica contra el ARN (73) y porque además que la 1-metil-3'-pseudouridina, además de todo lo anterior, también aumentaba la capacidad de traducción (74), Sin embargo, esto lo convierte en una molécula extraña a nivel enzimático para las células lo que hara que tarde mas en metabolizarse (75)

Diversos grupos han estudiado la mejor manera de modificar el genoma de células enfermas o cancerosas para revertirlas a una condición normal. Para lograr dicho objetivo, es necesario potenciar la entrada del material genético en la célula diana.

Los recientes avances en la tecnología de administración de genes y especialmente el gran progreso en la fabricación de nanopartículas lipídicas, han hecho posible la implementación de ARNm tratamientos antitumorales (76).

Se ha demostrado que la adición de polietilenglicol a las coberturas de nanolípidos mejora la internalización celular de estas tanto en la membrana externa como las internas consiguiendo excelentes resultados en el tratamiento de algunos cánceres y otras enfermedades secundarias a enfermedades genéticas puntuales.

Los LNP pueden entrar en su cerebro

En 2018, Shankar et al afirmaron que las LNP pueden ser ideales para los sistemas de administración de fármacos debido a su capacidad para eludir la barrera hematoencefálica y alcanzar el tejido cerebral debido a su pequeño tamaño y capacidad para esquivar el sistema endotelial reticular (77).

El problema es que estas vacunas hacen que el cuerpo produzca anticuerpos contra la proteína spike del SARS-CoV2 y dicha proteína es homóloga a las sincitinas humanas que se expresan de forma significativa en el cerebro (78). Por ese motivo, también pueden producir severa inflamación del tejido cerebral tal y como se ha visto tanto en los ensayos clínicos fase 2 y 3 como ahora en la fase 4 o post-autorización. Entre los efectos adversos neurológicos que pueden producir estas vacunas se incluyen: *Síndrome de Guillain-Barré, encefalomiелitis diseminada aguda, miелitis transversa, miелitis, parálisis de Bell, encefalitis, meningitis, miелitis, convulsiones, CVA, Narcolepsia* y otras enfermedades desmielinizantes agudas (79).

Además, la sincitina-1 es esencial en diversas funciones corporales, como la formación de la placenta. Diversos investigadores mostraron su preocupación porque el sistema inmunológico de la mujer podría reaccionar contra la sincitina y causarle esterilidad permanente (80). Sin embargo, la solicitud del Dr. Wolfgang Wodarg a la Agencia Europea de Medicina de suspender la fase 3 de la vacuna de Pfizer no fue escuchada.

Otro de los motivos de solicitar dicha suspensión fue la aparición de reacciones inmunes graves. Las LNP exógenas son interpretadas como señales de peligro para los

inflamomasas NLRP3, los efectos secundarios inflamatorios son atribuidos a los LNP y que empeoran con la inyección repetida. De hecho, dichos efectos secundarios fueron más frecuentes y graves después de la segunda dosis (81) y fueron observados tanto con la vacuna Pfizer (82) como la Moderna (71). Una de estas reacciones es la trombocitopenia inmunitaria que ya ha provocado muertes en EE. UU. Y representa un riesgo añadido grave para todas las personas que toman anticoagulantes orales, ya que el riesgo de hemorragia masiva es evidente.

En el caso de Moderna, las reacciones adversas sistémicas grado 3 (*que incapacitan para las actividades diarias*) aumentaron del 2,9% después de la primera dosis al 15,7% después de la segunda. Igualmente, las reacciones grado 4 (requieren acudir a urgencias y posible hospitalización) también se triplicaron tras la segunda dosis (81-83).

El PEG se utiliza en ciertos medicamentos que causan anafilaxia por lo que se cree que es el causante de las reacciones alérgicas y anafilácticas de las vacunas de Pfizer y Moderna (71,82). Por ello, algunos científicos creen que se deberían analizar la posible existencia de anticuerpos anti-PEG antes de recibir estas vacunas. Sin embargo, la FDA y los CDC alientan a las personas a vacunarse y arriesgarse a una reacción anafiláctica potencialmente mortal (71).

Addendum

A la vista de la información detallada previamente, la pregunta que debemos hacernos es en que punto debemos colocar a la nueva vacuna mRNA de Pfizer y otras similares que contienen mRNA envuelto en nanopartículas lipídicas y polietilenglicol.

Si existen datos comprobables que esa tecnología se ha utilizado para introducir material genético dentro del núcleo, para tratar el cáncer y otras enfermedades genéticas, simplemente no podemos aceptar que esta vacuna no lo hará, máxime cuando no se hicieron estudios específicos a nivel preclínico para evaluar dicho efecto.

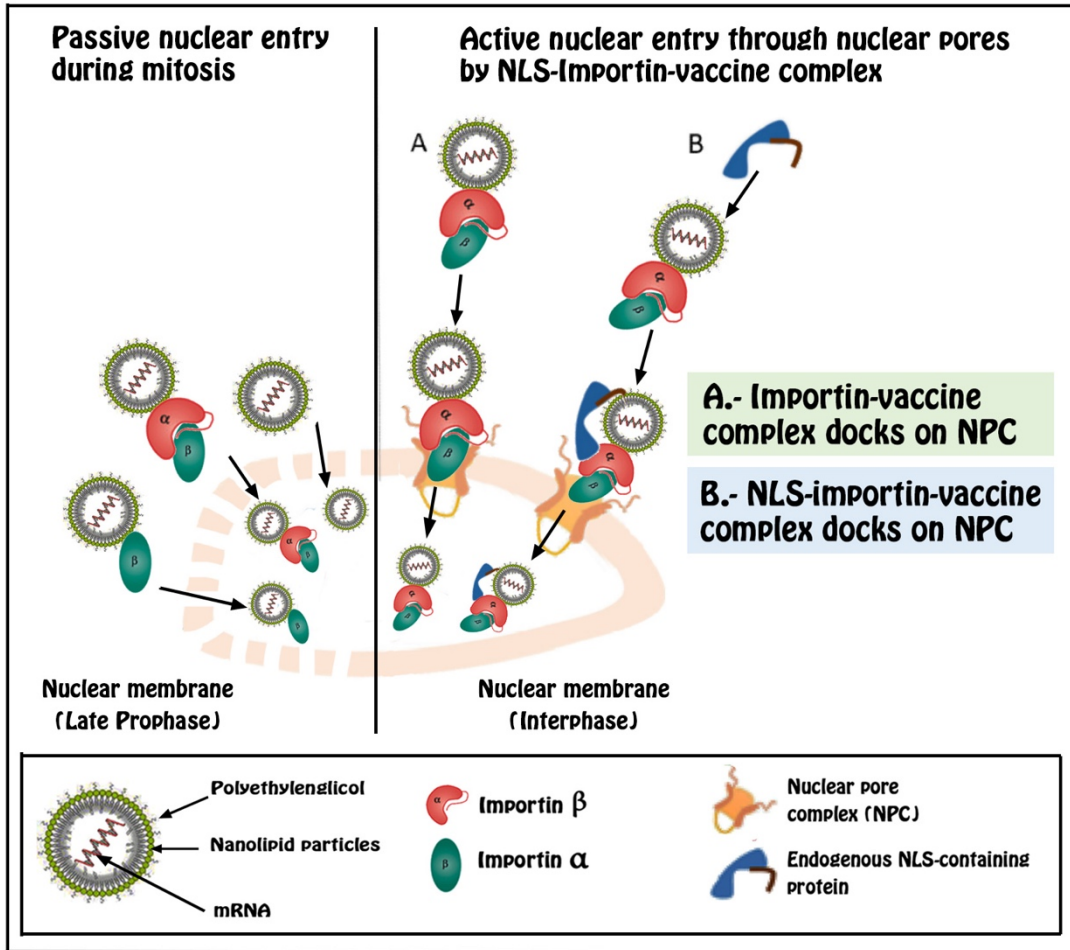
Si además sabemos que las células eucariotas tienen sus propias RT endógenas y que son capaces de realizar la conversión de RNA en DNA. ¿Como pueden asegurar que esta vacuna no vaya a integrarse dentro de nuestro genoma?

Existen demasiadas dudas a este respecto como para autorizar la utilización clínica de vacunas de este tipo. Las farmacéuticas que fabrican vacunas mRNA afirman que, dado que no utilizan el virus completo, su uso no puede contagiar a los vacunados. Sin embargo, desde que se comenzó la vacunación en residencias se están originando contagios masivos y muertes entre los ancianos de dichas residencias. Eso es un hecho clínico innegable y nadie da una respuesta adecuada a porque se originan dichos contagios poco después de la vacunación (84,85).

En nuestra opinión, su uso indiscriminado en cientos de millones de personas de todo el mundo para prevenir una enfermedad con una mortalidad en la población general entre el 0.3 y el 1% (86) es simplemente una temeridad carente de sentido ético.

Figuras

Fig. 1: Dos estrategias de entrada nuclear diferentes: vías pasivas vs activas. Durante la profase de mitosis y la meiosis, la membrana nuclear es disuelta y los complejos de ácidos nucleicos cercanos al núcleo tienen la posibilidad de entrar en él. Sin embargo, para las células en interfase (*fuera de la división celular*), el acoplamiento activo en el complejo de poros nucleares (NPC) a través de la vía importin alfa o beta resulta necesario. Modificado de: Lam A. & Dean D. *Progress and prospects: Nuclear import of nonviral vectors. Gene Ther.* 2010, 17(4):439–47.



References

- 1.- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020, 579, 265–9.
- 2.- Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF, A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 2020, 395, 470–3.
- 3.- mRNA vaccines. A new era in vaccinology. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261-79.
- 4.- Lavarone C, O'hagan DT, Yu D, Delahaye NF, Ulmer JB. Mechanism of action of mRNA based vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2017;16(9):871-81
- 5.- <https://www.modernatx.com/modernas-work-potential-vaccine-against-covid-19>
- 6.- <https://www.nytimes.com/2020/11/20/health/covid-vaccine-95-effective.html>
- 7.- Hodgson S, Mansatta K, Mallet G, Harris V, Emary K, Pollard A. What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis* 2021; 21: e26–35
- 8.- <https://www.nytimes.com/2015/03/10/health/protection-without-a-vaccine.html>
- 9.- Chung Y, Beiss V, Fiering S, Steinmetz N. COVID-19 Vaccine frontrunners and their nanotechnology design. *ACS Nano* 2020, doi: [10.1021/acsnano.0c07197](https://doi.org/10.1021/acsnano.0c07197)
- 10.- Buschmann M, Carrasco M, Alishetty S, Paige M, Alameh M, Weissman D. Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. *Vaccines* 2021, 9, 65. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010065>
- 11.- <https://childrenshealthdefense.org/news/components-of-mrna-technology-could-lead-to-significant-adverse-events-in-one-or-more-of-our-clinical-trials-says-moderna/>
- 12.- <https://anthraxvaccine.blogspot.com/2021/01/maine-emts-being-given-false-and.html>
- 13.- <https://www.fda.gov/media/144246/download>
- 14.- <https://www.statnews.com/2017/01/10/moderna-trouble-mrna/>
15. <https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1682852/000119312518323562/d577473ds1.htm>
- 16.- Dai L, Gao G. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nature Reviews Immunology* volume 21, pages73–82(2021)Cite this article
- 17.- Blakney A, Ip S, Geall A. An update on self-amplifying mRNA vaccine development. *Vaccines* 2021, 9, 97. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020097>
- 18.- Xu S, Yang K, Li R, Zhang L. mRNA Vaccine Era—Mechanisms, drug platform and clinical propection. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6582; doi:10.3390/ijms21186582
- 19.- Griffiths D. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol* 2001, 2(6): doi: 10.1186/gb-2001-2-6-reviews1017
- 20.- Sahin, U., Karikó, K., and Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2014, 13, 759–80. doi: 10.1038/nrd4278
- 21.- Guevara, M. L., Persano, S., and Persano, F. Lipid-based vectors for therapeutic mRNA-based anti-cancer vaccines. *Curr Pharm Des.* 2019, 25:1443–54. doi: 10.2174/1381612825666190619150221
- 22.- O'Connor, C. Cell Division: Stages of Mitosis. *Nature Education* 2008, 1(1):188. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/mitosis-and-cell-division-205/>
- 23.- Cheeseman, I. M., & Desai, A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008, 9, 33–46. doi:10.1038/nrm2310
- 24.- Hagstrom, K. A., & Meyer, B. J. Condensin and cohesin: More than chromosome compactor and glue. *Nature Reviews Genetics* 2003, 4, 520–34. doi:10.1038/nrg1110

- 25.- Cremer, T., & Cremer, C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics* 2001, 2, 292–301. doi:10.1038/35066075
- 26.- Hirano, T. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002, 7, 311-22 doi:10.1038/nrm1909
- 27.- Paweletz, N. Walther Flemming: Pioneer of mitosis research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001, 2, 72–5 doi:10.1038/35048077
- 28.- Ohkura H. Meiosis an overview of key differences from mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Jan 20;7(5): a015859. doi: 10.1101/cshperspect.a015859
- 29.- Grelon M. Meiotic recombination mechanism. *C R Biol.* 2016;339(7-8):247-51. doi: 10.1016/j.crv.2016.04.003.
- 30.- Eguizabal C, Montserrat N, Vassena R, et al. Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2011;29(8):1186-95. DOI:10.1002/stem.672
- 31.- Arbel A, Simchen G. Elevated mutagenicity in meiosis and its mechanism. *Bioessays.* 2019 Apr;41(4):e1800235. doi: 10.1002/bies.201800235.
- 32.- Rangel G & Alves R. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)* 2017, 15(3):369-75
- 33.- Ni R, Feng R, Chau Y. Synthetic Approaches for Nucleic Acid Delivery: Choosing the Right Carriers. *Life (Basel)* 2019; 9(3): 59. doi:10.3390/life9030059
- 34.- Mieruszynski, S.; Digman, M.A.; Gratton, E.; Jones, M.R. Characterization of exogenous DNA mobility in live cells through fluctuation correlation spectroscopy. *Sci. Rep.* 2015, 5, 13848.
- 35.- Panté, N.; Kann, M. Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of about 39nm. *Mol. Biol. Cell* 2002, 13, 425–434
- 36.- Mechanism of mRNA transport in the nucleus.
- 37- Synthetic Approaches for Nucleic Acid Delivery: Choosing the Right Carriers
- 38.- Luqye JC. La capa de invisibilidad" para las nanopartículas. *Rev ciencias Univ Pablo Olavide* 2012, 6:101-3
- 39.- Zhanga P, Suna F, Liub S, Jianga S. Anti-PEG antibodies in the clinic: current issues and beyond PEGylation. *J Control Release* 2016, 244(pt B):184-93
- 40.- Garay R, El-Gewely R, Armstrong J, Garratty G, Richette P. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEGconjugated agents. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2012, 9:11, 1319-1323
- 41.- Yang Qi Jacobs T, McCallen J, Moore D, Huckaby J, Eldestein J, Lai S. Analysis of pre-existing IgG and IgM antibodies against Polyethylene Glycol (PEG) in the general population. *Anal Chem.* 2016; 88(23):11804–12
- 42.- <https://www.sciencemag.org/news/2020/12/suspicious-grow-nanoparticles-pfizer-s-covid-19-vaccine-trigger-rare-allergic-reactions>
- 43.- Arana L, Bayo L, Sarasola L, Berasategui M, Ruiz S & Alkorta I. Chemotoxic treatment in an oral carcinoma cell Line. *Nanomaterials* 2019, 9, 464
- 44.- Guevara M, Persano F, Persano S. Advances in Lipid Nanoparticles for mRNA-Based Cancer Immunotherapy. *Frontiers in chemistry* 2020 8: 589959
- 45.- Kranz, L. M., Diken, M., Haas, H., Kreiter, S., Loquai, C., Reuter, K. C., et al. (2016). Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer
- 46.- Reichmuth A, Oberti M, Jaklenec A, Langer R, Blankschtein D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther Deliv.* 2016, 7(5):319-34
- 47.- Gómez I, Rodríguez J, Vicente M. Nanomedicines to Deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives. *Nanomaterials* 2020, 10, 364; doi:10.3390/nano10020364
- 48.- Richter AW, Akerblom E. Polyethylene glycol reactive antibodies in man: titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene glycol

modified allergens or placebo, and in healthy blood donors. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984; 74:36-9

49.- Tian L, Kim M, Li H, Wang J, Yang W. Structure of HIV-1 reverse transcriptase cleaving RNA in an RNA/DNA hybrid. *PNAS*. 2018, 115(3):507-12.

50.- Hu W, Hughes S. HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(10): a006882. doi: 10.1101/cshperspect.a006882

51.- Dharan, A., Bachmann, N., Talley, S. et al. Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus. *Nat Microbiol* 2020, 5: 1088–95.

52.- Selyutina, A, Persaud M, Lee K, Kewa V, Diaz F. Nuclear Import of the HIV-1 Core Precedes Reverse Transcription and Uncoating. *Cell press* 2020, 32(13): 108201

53.- Cartier R & Reszka R. Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene Therapy* 2002, 9, 157–167

54.- Christ F, Thys W, De Rijk J, Gijssbers R, Albanese A, Arosio D et al. Transportin-SR2 imports HIV into the nucleus. *Curr Biol* 2008, 18(16): 1192-202

55.- Luban J. HIV-1 infection: going nuclear with TNPO3/Transportin-SR2 and integrase. *Curr Biol* 2008, 18(16): R710-3

56.- Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Rytte AS, Yurchenko LY, Vlassov W Mechanisms of oligonucleotide uptake by cells : Involvement of specific receptors?. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, 86:6454-8.

57.- Lee YN, Bieniasz PD Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog* 2007, 3.

58.- Kitamura Y, Ayukawa T, Ishikawa T, Kanda T, Yoshiike K. Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *J Virol* 1996, 70: 3302-6.

59.- Dewannieux M, Harper F, Richaud A, Letzelter C, Ribet D, Pierron G, Heidmann T. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res* 2006, 16:1548-56.

60.- Dewannieux M, Ribet D, Heidmann T. Risks linked to endogenous retroviruses for vaccine production: a general overview. *Biologicals* 2010, 38:366-70.

61.- Belshaw R, Dawson AL, Woolven-AUen J, ReddingJ, Burt A, Tristem M. Genome wide screening reveals high levels of insertional polymorphism in the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML2): Implications for present-day activity. *J Virol* 2005, 79:12507-14.

62.- Victoria JG, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, Delwart EL. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus *J Virol* 2010, 84, 6033-40.

63.- Brady T, Lee YN, Ronen K, Malani N, Berry CC, Bieniasz PD, Bushman FD. Integration target site selection by a resurrected human endogenous retrovirus. *Genes Dev* 2009, 23:633-42.

64.- Jarzyna P, Doan N, Deisher T. Insertional mutagenesis and autoimmunity induced disease caused by human fetal and retroviral residual toxins in vaccines. *Issues in Law & Medicine* 2016, 31(2):221-34

65.- Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008, 118:3132-42.

66.- Vargas D,Raj A, Marras S, Kramer F, Tyagi S. Mechanism of mRNA transport in the nucleus. *PNAS* 2005, 102(47): 17008–13.

67.- Gladyshev E & Arkhipova I. A widespread class of reverse transcriptase-related cellular genes *PNAS* 2011, 108(51). 20311e20316

68.- Spadafora C. A Reverse transcriptase-dependent mechanism plays central roles in fundamental biological processes. *Syst Biol Reprod Med* 2008, 54(1):11-21

- 69.- Sciamanna I, Landriscina M, Pittoggi C, Quirino M, Mearelli C, Beraldi R et al Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene* 2005, 24:3923–31. doi:10.1038/sj.onc.1208562
- 70.- Zhang L, Richards A, Khalil A, Wogram E, Ma H, Young R, Jenisch R. SARS-CoV-2 RNA reverse-transcribed and 1 integrated into the human genome. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.12.12.422516>
- 71.- <https://articles.mercola.com/sites/articles/archive/2021/02/10/nanoparticles-in-moderna-vaccine.aspx>
- 72.- Nicholson A. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev* 1999, 23(3): 371-90
- 73.- Durbin A, Wang C, Marcotrigiano J, Gehrke L. RNAs Containing Modified Nucleotides Fail To Trigger RIG-I Conformational Changes for Innate Immune Signaling. *Bio*. 2016 Sep 20;7(5):e00833-16.
- 74.- Syitkin Y, Cheng Y, Chackraborty T, Presnvak V, John M, Sonenberg N. N1-methyl-pseudouridine in mRNA enhances translation through eIF2 α -dependent and independent mechanisms by increasing ribosome density. *Nucleic Acid Res*. 2017; 45(10):6023-36.
- 75.- <https://montoliu.naukas.com/2020/12/27/la-ciencia-que-hay-detras-de-la-primera-vacuna-contr-la-covid-19/>
- 76.- Grunwitz C, Krantz L. mRNA Cancer vaccines-messages that prevail. *Curr Top Microbiol Immunol* 2017; 405:145-64. doi: 10.1007/82_2017_509.
- 77.- Shankar R, Joshi M, Pathak K. Lipid Nanoparticles: A Novel Approach for Brain Targeting. *Pharm Nanotechnol*. 2018;6(2):81-93.
- 78.- Shankar R, Joshi M, Pathak K. Lipid Nanoparticles: A Novel Approach for Brain Targeting. *Pharm Nanotechnol*. 2018;6(2):81-93.
- 79.- <https://www.fda.gov/media/143557/download>
- 80.- https://web.archive.org/web/20201209042033/https://2020news.de/wp-content/uploads/2020/12/Wodarg_Yeadon_EMA_Petition_Pfizer_Trial_FINAL_01DEC2020_EN_unsigned_with_Exhibits.pdf
- 81.- <https://www.jhsph.edu/covid-19/articles/side-effects-and-covid-19-vaccines-what-to-expect.html>
- 82.- <https://www.fda.gov/media/144245/download>
- 83.- <https://www.fda.gov/media/144452/download>
- 84.- <https://www.euroweeklynews.com/2021/01/15/huge-outbreak-in-benidorm-nursing-home-after-covid-jab/>
- 85.- <https://www.bbc.com/news/uk-scotland-edinburgh-east-fife-55962427>
- 86.- Anderson RM, Heesterbeek H, Klinkenberg D, Hollingsworth TD. How will country-based mitigation measures influence the course of the COVID-19 epidemic? *The Lancet* 2020 [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30567-5/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30567-5/abstract)