Facultad de Farmacia
Universidad de La Laguna

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica
Universidad de La Laguna

MUTACIONES CAUSANTES DE HIPOMAGNESEMIA CON HIPOCALCEMIA SECUNDARIA;

PREDICCIÓN IN SILICO DE SU EFECTO EN EL PROCESAMIENTO DEL ARNm y APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS ESPECÍFICAS DE ARN

GRADO EN FARMACIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

CURSO 2021-2022

Alumna: Cynthia Dorta Pérez

Tutor: Alexis Oliva Martín

Cotutora: Elena Ramos Trujillo

ÍNDICE

ABREVIATURAS 3

ABSTRACT 4

RESUMEN 5

1. INTRODUCCIÓN 6
   - 1.1. METABOLISMO DEL Mg^{2+} 6
   - 1.2. HIPOMAGNESEMIA PRIMARIA CON HIPOCALCEMIA SECUNDARIA 6
   - 1.3. EL ÁCIDO RIBONUCLEICO 7
   - 1.4. ARN MENSAJERO 7
   - 1.5. SECUENCIAS REGULADORAS DEL PROCESAMIENTO DEL PRE-ARNm 8
   - 1.6. MUTACIONES DE *SPLICING* Y MUTACIONES EXÓNICAS 9
   - 1.7. ARN NO CODIFICANTE 10
   - 1.8. TERAPIAS BASADAS EN ARN 10
2. JUSTIFICACIÓN DE TRABAJO Y OBJETIVOS 11
3. MATERIALES Y MÉTODOS 12
   - 3.1. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA 12
   - 3.2. ANÁLISIS *IN SILICO* 12
4. RESULTADOS 14
   - 4.1. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA 14
     - 4.1.1. TERAPIAS ESPECÍFICAS DE ARN 14
     - 4.1.2. TIPOS DE TERAPIAS ARN 14
     - 4.1.3. VENTAJAS DE LAS TERAPIAS ARN 17
   - 4.2. ANALISIS IN SILICO 18
5. DISCUSIÓN 23
6. CONCLUSIONES 24
7. BIBLIOGRAFÍA 25
8. ANEXO: MUTACIONES DESCRITAS EN PACIENTES CON HSH 30

ABREVIATURAS

HSH	Hipomagnesemia primaria con hipocalcemia secundaria
IV	Intravenosa
Kg	Kilogramo
TRPM6	Potencial de receptor transitorio melastatina 6
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Mg	Magnesio
Ca	Calcio
mg	Miligramo
dL	Decilitro
mmol	Milimol
ARNnc	ARN no codificante
ARNt	ARN de transferencia
ARNsno	ARN nucleolares
ARNnn	Pequeños ARN nucleares
ARNr	ARN ribosómico
ARNsi	Pequeño ARN de interferencia
endo-ARNsi	ARN pequeños de interferencia endógenos
ARNmi	microARN
ARNpi	ARN pqueños asociados a Piwi
ARNlnc	ARN no codificante largos
ESE	Exonic Splicing Enhancer
ISE	Intronic Splicing Enhancer
ESS	Exonic Splicing Silencer
ISS	Intronic Splicing Silencer

ABSTRACT

Hypomagnesaemia with secondary hypocalcemia is a rare autosomal recessive disease characterized by magnesium deficiency, caused by mutations in the *TRPM6* gene and for which there is no specific treatment beyond the administration of high doses of magnesium for life.

RNA-based therapies are a new technology to prevent and combat diseases, including rare and ultra-rare ones, such as HSH.

The objective of this work is to review the main RNA-based therapies and to carry out a computational study of the missense, synonymous and splicing mutations that cause HSH, which allows us to determine if any of them potentially affects at the RNA level, and we will discuss the possible applicability of some of the therapies described in certain cases of HSH.

For the bibliographic review of RNA-specific therapies, the information collected corresponds to studies that have been published in the last 10 years in journals that are relatively relevant, and a series of bioinformatic tools were used for the *in silico* analysis.

According to our *in silico* analysis of HSH-causing mutations, some of the exonic missense and synonymous mutations, in addition to all the intronic ones, could be affecting the splicing process, preventing the recognition by the spliceosome of the donor or acceptor site, and these patients could be potentially treated with RNA based therapies.

RESUMEN

La hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria es una rara enfermedad autosómica recesiva caracterizada por deficiencia de Mg^{2+}, causada por mutaciones en el gen *TRPM6* y para la que no existe un tratamiento específico más allá de la administración de altas dosis de Mg de por vida.

Las terapias basadas en ARN son una nueva tecnología para prevenir y combatir enfermedades, entre ellas las raras y ultra-raras, como la HSH.

El objetivo de este trabajo es revisar las principales terapias basadas en ARN y llevar a cabo un estudio computacional de las mutaciones de cambio de sentido, silentes y de *splicing* causantes de HSH, que nos permita determinar si alguna de las mismas afecta potencialmente a nivel de ARN, y discutiremos la posible aplicabilidad de alguna de las terapias descritas en ciertos casos de HSH.

Para la revisión bibliográfica de las terapias específicas de ARN la información recopilada se corresponde a estudios que han sido publicados en los últimos 10 años en revistas que presentan relativa relevancia y para el análisis *in silico* se utilizaron una serie de herramientas bioinformáticas.

Según nuestro análisis *in silico* de mutaciones causantes de HSH, las mutaciones exónicas de cambio de sentido y la sinónima, además de todas las intrónicas, podrían estar afectando al proceso de *splicing*, impidiendo el reconocimiento por parte del espliceosoma del sitio donador o el aceptor, de manera que los pacientes portadores podrían ser potencialmente tratados con terapias basadas en ARN.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. METABOLISMO DEL Mg^{2+}

El Mg es un elemento esencial necesario para más de 300 reacciones bioquímicas en el cuerpo humano y un constituyente principal del tejido óseo. Ayuda a mantener el funcionamiento normal de músculos y nervios, a ajustar los niveles de glucosa en la sangre, en la producción de energía y proteína, mantiene constantes los latidos del corazón. Además, los iones Mg^{2+} son necesarios para la producción de la hormona paratiroidea que regula las concentraciones de calcio en la sangre (1). La homeostasis del Mg^{2+} se mantiene mediante la reabsorción renal e intestinal, aunque el riñón juega un papel predominante (2).

La incapacidad del organismo para absorber y retener el Mg que se adquiere a través de la dieta conduce a una hipomagnesemia, que es la concentración sérica de Mg < 1,8 mg/dL (< 0,70 mmol/L) (3).

1.2. HIPOMAGNESEMIA PRIMARIA CON HIPOCALCEMIA SECUNDARIA (HSH)

La HSH es una rara enfermedad autosómica recesiva caracterizada por deficiencia de Mg^{2+} debido a una absorción intestinal deficiente y una pérdida renal, lo que provoca niveles bajos de Mg^{2+} séricos y un metabolismo aberrante del calcio (4). El síntoma predominante son las convulsiones generalizadas y recurrentes. Las características adicionales que se observan en el período neonatal incluyen tetania (que no responde a la terapia con calcio), retraso en el crecimiento, inquietud, temblores, espasmos musculares y cianosis perioral, pudiéndose observar arritmia cardiaca (5). La hipomagnesemia prolongada e intensa causa hipoparatiroidismo que eventualmente conduce a la hipocalcemia secundaria en los pacientes (6), definida como una concentración sérica de Ca^{2+} total por debajo del límite inferior de la normalidad (<8,5 mg/dl o 2,1 mmol/l) y en el caso del Ca iónico <4,6 mg/dl o 1,15 mmol/l (3). El diagnóstico tardío puede llevar a los pacientes a una lesión neurológica permanente o incluso a la muerte súbita como resultado de las arritmias (3).

La HSH no dispone de un tratamiento específico más allá de la administración de altas dosis de Mg -0,1-0,2 mmol (equivalente a 25-50 mg) Kg/peso corporal, hasta un máximo de 8 mmol (equivalente 2 g)-, generalmente por vía IV, que solo conduce al

alivio de los síntomas clínicos, la normocalcemia y la normalización de los niveles de PTH (7). La terapia parenteral aguda es seguida por la administración de suplementos orales de Mg en dosis altas de por vida (7).

Se ha descubierto que mutaciones en el gen *TRPM6* son las causantes de la HSH (8). El gen *TRPM6* humano (NCBI ID 140803) se encuentra localizado en el cromosoma 9 (9q21.13) y está formado por 39 exones (9). La proteína *TRPM6* (canal catiónico de potencial de receptor transitorio melastatina 6) es una proteína que posee un dominio de canal iónico de Mg^{2+} y un dominio de proteína quinasa C-terminal (9). Se han encontrado al menos 84 mutaciones diferentes en el gen *TRPM6* en personas con HSH, que dan lugar en su mayoría a una deficiencia de proteína funcional (mutaciones de cambio de sentido o *missense*, sin sentido o *nonsense*, de cambio de pauta de lectura o *frameshift*, deleciones, inserciones y de maduración del ARNm o *splicing*) (10).

1.3. EL ÁCIDO RIBONUCLEICO (ARN)

El ARN es un ácido nucleico esencial para el desarrollo de cualquier forma de vida, participa en la síntesis de proteínas, en la regulación de la expresión génica, la modificación de otras moléculas de ARN y en la catálisis química, entre otros (11).

1.4. ARN MENSAJERO (ARNm)

El ARNm es una molécula fundamental para la traducción. La mayoría de los genes humanos se organizan en secuencias codificantes, que son traducidas a proteínas, llamadas exones, y secuencias no codificantes, denominadas intrones; estos deben ser eliminados para que la información transcrita pueda ser traducida correctamente. Las moléculas de ARN inmaduras sintetizadas mediante la transcripción se denominan pre-ARNm (11).

El proceso de maduración del pre-ARNm se denomina *splicing*, se trata de un proceso de “corte y empalme”, donde se eliminan los intrones y se unen los exones para producir una molécula de ARNm maduro (figura 1.A).

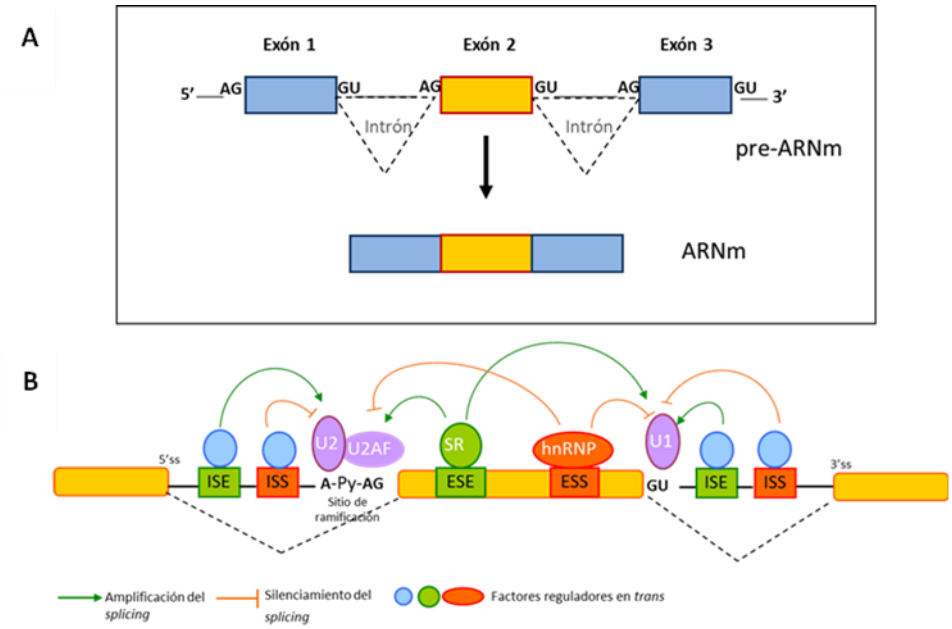

Figura 1. (A) Procesamiento del pre-ARNm (corte y empalme o *splicing*). **(B)** Elementos reguladores del proceso de *splicing* . Adaptado de Claverie-Martin *et al*., 2015 (12)

1.5. SECUENCIAS REGULADORAS DEL PROCESAMIENTO DEL PRE-ARNm

El procesamiento del pre-ARNm está regulado por secuencias consenso que ayudan a definir las regiones intrónicas y exónicas, como los dinucleótidos situados en los extremos 5' y 3' de los intrones, llamados sitios donador y aceptor, respectivamente. Estos indican a la maquinaria celular (espliceosoma) las posiciones dónde debe ocurrir el corte (13). Además, las moléculas de pre-ARNm portan elementos encargados de modular su procesamiento, a través de la unión a diferentes proteínas pertenecientes al espliceosoma (Figura 1.B). Estas secuencias pueden tener una función amplificadora del proceso (sitios ESE o ISE), es decir, que favorecen la inclusión de una región determinada en la molécula final, o inhibidora o silenciadora del mismo (sitios ESS o ISS), es decir, que favorecen la exclusión de una región en el ARNm maduro (14). Las proteínas pertenecientes al espliceosoma encargadas de reconocer estos elementos son respectivamente las SR (del inglés *Serin/Arginine-rich (SR) proteins)* y las hnRNP (del inglés *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) (14-17).

1.6. MUTACIONES DE *SPLICING* Y MUTACIONES EXÓNICAS

Las secuencias conservadas de los sitios donador y aceptor del *splicing* son susceptibles de ser alteradas mediante la sustitución de un nucleótido por otro, de manera que mutaciones localizadas en los extremos 5' y 3' de los exones, o en zonas próximas tanto intrónicas como exónicas, pueden alterar la capacidad de reconocimiento del exón por parte del espliceosoma (Figura 2) (18). Las mutaciones de cambio de sentido son aquellas localizadas en regiones codificantes de los genes que dan lugar al cambio de un aminoácido por otro en la proteína codificada pudiendo generar la pérdida total o parcial de la actividad de la proteína, alterar la estructura de la que formará parte, o afectar su localización celular. Sin embargo, entre un 15-25% de éstas también alteran el procesamiento del pre-ARNm (19). Esto es debido a que dichas mutaciones alteran o eliminan secuencias del pre-ARNm implicadas en su procesamiento, actuando como verdaderas mutaciones de *splicing* (Figura 2) (20-22) y generando cambios mucho más drásticos en la proteína resultante que los que cabría esperar por el cambio de aminoácido predicho (23).

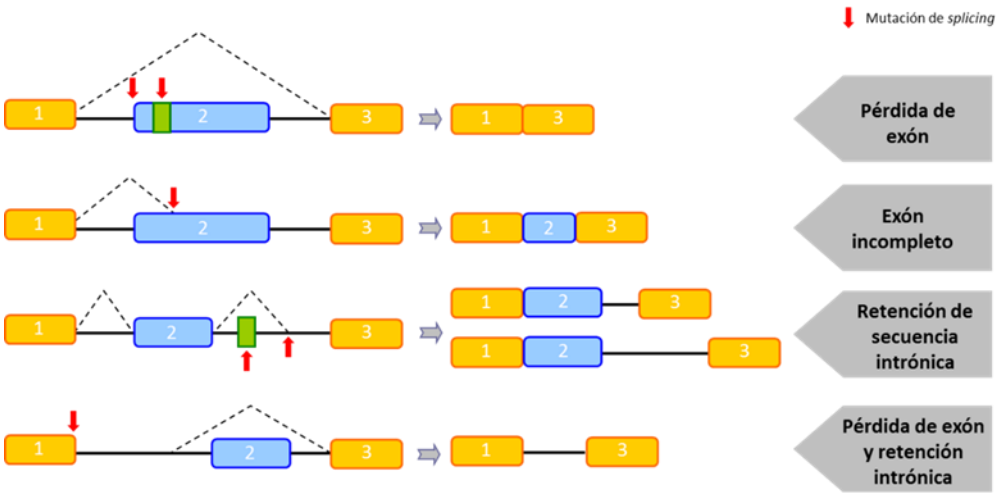

Figura 2. Alteraciones de *splicing* causadas por mutaciones.

1.7. ARN NO CODIFICANTE (ARNnc)

Casi el 98% del genoma de los mamíferos se transcribe en ARNnc que regulan la expresión de los genes y la función de las proteínas. Se han clasificado en ARNnc constitutivos que realizan funciones esenciales en el organismo; los ARN de transferencia (ARNt), que trasporta aminoácidos, los pequeños ARN nucleolares (ARNsno) para las modificaciones del ARN, los pequeños ARN nucleares (ARNnn) para el proceso de *splicing,* y el ARN ribosómico (ARNr) para la síntesis de proteínas (24), y los ARNnc reguladores que son; los microARNs (ARNmi), los ARN pequeños de interferencia endógenos (endo-ARNsi), los ARNs pequeños asociados a PIWI (ARNpi) y los ARNnc largos (ARNlnc) (25), que intervienen en procesos como el control de la traducción y la estabilidad del ARN, la regulación de la expresión génica, regulación epigenética y la estructura nuclear (24).

1.8. TERAPIAS BASADAS EN ARN

Gracias al Proyecto Genoma Humano (HGP) los investigadores han podido revelar el importante papel de los ARN codificantes y no codificantes en diversas enfermedades (26). Esto ha proporcionado información potencial para el desarrollo de posibles tratamientos para diversas enfermedades mediante la introducción de ácidos nucleicos en la célula para controlar la expresión de genes alterados de forma permanente o transitoria (26). En los últimos años se han desarrollados nuevas terapias basadas en ARN, una nueva tecnología para prevenir y combatir enfermedades, entre ellas, las enfermedades raras como la HSH (27).

La mayoría de las terapias de ARN se pueden clasificar en 3 categorías: las que se dirigen a los ácidos nucleicos (ya sea ADN o ARN), las que se dirigen a las proteínas y las que codifican las proteínas (28).

2. JUSTIFICACIÓN DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La mayoría de las mutaciones descritas para la HSH son exónicas y de *splicing*. Entre un 15-25% de las mutaciones exónicas (de cambio de sentido o silentes) alteran el procesamiento del ARNm y su efecto es más drástico que el cambio de un aminoácido por otro.

Nuestro objetivo es predecir el posible efecto de mutaciones exónicas causantes de HSH descritas en el gen *TRPM6* a nivel de ARNm y discutir la posible aplicación o eficacia de las terapias específicas de ARN desarrolladas en los últimos años.

En concreto:

- Analizar con herramientas bioinformáticas (*in silico*) el posible efecto sobre el procesamiento del pre-ARNm de mutaciones exónicas y de *splicing* causantes de HSH

- Realizar una revisión bibliográfica de las terapias específicas de ARN y discutir su aplicabilidad en los resultados del análisis *in silico*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para la revisión bibliográfica se recurrió a las siguientes bases de datos, revistas y bibliotecas virtuales gratuitas para recopilar la información: Pubmed, Google académico y MedlinePlus, utilizando las siguientes palabras clave solas o en combinación, tanto en español como en inglés: "hipomagnesemia primaria con hipocalcemia secundaria", "mutaciones", "gen *TRPM6*", "terapias basadas en ARN". Se empleó como gestor bibliográfico el programa RefWorks.

Los criterios de inclusión y exclusión de los recursos se basan, principalmente, en la antigüedad, índice de impacto e idioma de las publicaciones. Concretamente, la información recopilada se corresponde a estudios que han sido publicados en los últimos 10 años en revistas que presentan relativa relevancia. Aunque, ocasionalmente se ha recurrido a fuentes más antiguas para corroborar datos o descripciones encontradas en referencias más recientes.

3.2. ANÁLISIS *IN SILICO*:

La base de datos de mutaciones de genes humanos (HGMD®) profesional 2022.1 (https://my.qiagendigitalinsights.com/bbp/view/hgmd/pro/start.php) para el gen *TRPM6* (NM_017662.5) recoge un total de 44 mutaciones de cambio de sentido o missense y sin sentido o nonsense, y 16 mutaciones de *splicing (*sustituciones con consecuencias para el empalme (*splicing*) del ARNm. Las posiciones dadas como números enteros positivos se refieren a una ubicación de 3' (corriente abajo del intrón), los números enteros negativos se refieren a una ubicación de 5' (corriente arriba del intrón) (ver anexo).

Se excluyeron del análisis las mutaciones sin sentido, aquellas mutaciones para las que no estaba disponible la secuencia de nucleótidos y tres mutaciones en TRPM6 cuyo fenotipo no era la hipomagnesemia sino trastornos del espectro autista. Las mutaciones seleccionadas se recogen en la Tabla 2. Se analizó un total de 36 mutaciones; 21 variantes de cambio de sentido, 1 variante sinónima y 14 de *splicing*.

Para predecir el posible impacto en el proceso de *splicing* de las mutaciones seleccionadas se utilizó; *Human Splicing Finder* (HSF, https://www.genomnis.com/) que

permite la identificación de todas las señales de *splicing*, incluidos los sitios aceptores y donadores, los puntos de ramificación y las secuencias auxiliares; ESE y ESS (29).

Para el análisis predictivo del grado de patogenicidad de las mutaciones de cambio de aminoácido seleccionadas se utilizó: SIFT (30) (https://sift.bii.a-star.edu.sg/), Mutation Taster (31) (https://www.mutationtaster.org/), Polyphen2 (32) (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) y CADD (https://cadd.gs.washington.edu/) (33). Estas herramientas realizan una clasificación de las variantes introducidas basada en sus propios algoritmos, otorgándoles una puntuación que será mayor o menor en base a su impacto en la proteína. En el caso de CADD scores, los valores más altos (punto de corte recomendado de 15) indican que es más probable que una variante tenga efectos nocivos.

4. RESULTADOS

4.1. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

4.1.1. TERAPIAS ESPECÍFICAS DE ARN

Las terapias específicas de ARN son aquellas basadas en el uso de moléculas de ARN para modular vías biológicas implicadas en determinadas patologías. En general, la secuencia de ARN es la clave para manipular la expresión o actividad de sus moléculas diana (34).

4.1.2. TIPOS DE TERAPIAS DE ARN

La mayoría de las terapias de ARN pueden clasificarse en una de las tres grandes categorías: las que se dirigen específicamente a los ácidos nucleicos (ya sea ADN o ARN), las que tienen proteínas como dianas, y las que codifican proteínas. También están surgiendo enfoques híbridos que combinan varios de estas alternativas (28) (Tabla 1).

Fármaco de ARN	Marca comercial	Año de aprobación	Mecanismo de acción	Enfermedad objetivo
Oligonucleótidos antisentido				
Fomivirsen	Vitravene	1998	Inhibición de la traducción del ARNm viral que codifica la proteína	IE2 retinitis por citomegalovirus
Mipomersen	Kynamro	2013	Inducción de la degradación del ARNm de APOB	Hipercolesterolemia familiar
Nusinersen	Spinraza	2016	Inducción de inclusión de exón en ARNm de SMN2	Atrofia muscular en la columna
Eteplirsen	Exondys 51	2016	Inducción de salto de exón en ARNm de DMD	Distrofia muscular de Duchenne
Inotersen	Tegsedi	2018	Inducción de la degradación del ARNm de TTR	Amiloidosis por transtiretina hereditaria
Golodirsen	Vyondys 53	2019	Inducción de salto de exón en ARNm de DMD	Distrofia muscular de Duchenne
Pequeños ARN de interferencia				
Patisirán	Onpattro	2018	Escisión mediada por interferencia de ARN de ARNm de TTR	Amiloidosis por transtiretina hereditaria
Givosirán	Givlaari	2019	Escisión mediada por interferencia de ARN de ARNm de ALAS1	Porfiria hepática aguda
Lumasiran	Oxlumo	2020	Escisión mediada por interferencia de ARN de ARNm de HAO1	Hiperoxaluria primaria tipo 1
Inclisirán	Leqvio	2021	Escisión mediada por interferencia de ARN de ARNm de PCSK9	Hipercolesterolemia
Aptámeros de ARN				
Pegaptanib	Macugen	2004	Unión antagonista a la proteína VEGF	La degeneración macular relacionada con la edad
ARN mensajeros				
Tozinamerán	Comuna	2020	Inducción de la respuesta inmunitaria mediante la producción de la proteína espiga del SARS-CoV-2	COVID-19
Elasomerano	Spikevax	2020	Inducción de la respuesta inmunitaria mediante la producción de la proteína espiga del SARS-CoV-2	COVID-19

Tabla 1. Principales fármacos basados en ARN aprobados para su uso en humanos

La terapia ARN antisentido se basa en la utilización de una molécula corta de ADN diseñado para ser parte complementaria (antisentido) de un ARNm y así prevenir la expresión de la correspondiente proteína alterada (35).

Los oligonucleótidos más representados (alrededor del 65% del total) son los oligonucleótidos **antisentido (ASO)**. Se subdividen en dos grupos según su modo de acción; ASOs inhibidores de la expresión génica y ASOs moduladores de *splicing* (35). Los primeros actúan vía mecanismos que implican a la ARNasa H (36). Los moduladores del *splicing* están diseñados para unirse a las uniones intrón-exón de los pre-ARNms donde producen un bloqueo estérico del reconocimiento de las regiones reguladoras del *splicing* (36). La mayoría de los moduladores de *splicing* tienen una estructura química similar a la del ADN, pero incluyen modificaciones químicas para evitar el reconocimiento por parte de la ARNasa H de los dúplex formados entre los pre-ARNm y los inhibidores del *splicing* (35). Los ASOs pueden actuar de diferentes maneras: excluyendo un pseudoexón debido a una mutación en el punto de empalme exón-intrón, induciendo la "eliminación" o "silenciamiento" de exones que contienen una mutación, saltándose uno o más exones que flanquean una deleción de forma que se altera la lectura sorteando la zona mutada o forzando la selección de un punto de *splicing* alternativo.

Nusinersen es un ASO aprobado para combatir la atrofia muscular espinal, causada por una mutación en el gen SMN1 (34).

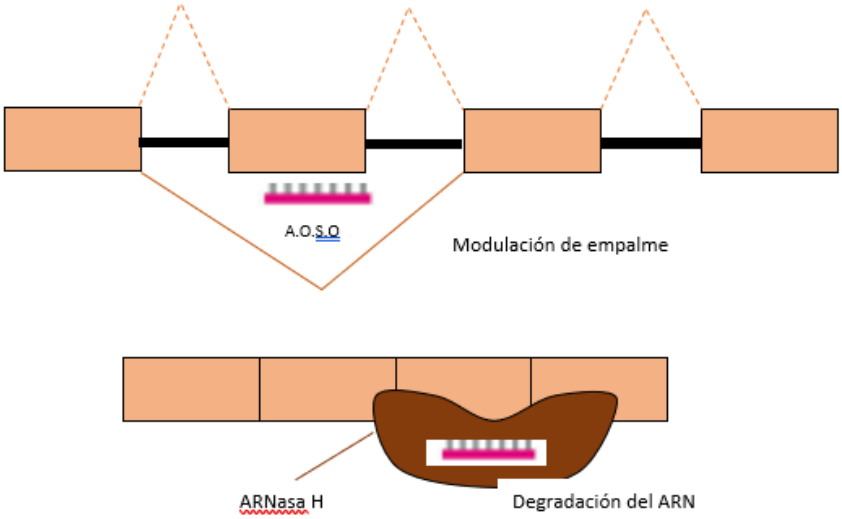

Figura 3. Mecanismo de acción de los ASO

El segundo tipo de oligonucleótidos son **los ARNsi**, representando un 32% del número total. Los ARNsi son moléculas de ARN de doble cadena capaces de hibridarse específicamente con su ARN diana y modular su expresión (37). En el ARNi nativo, los ARNs endógenos forman un complejo con la proteína Argonauta (Ago) para producir un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que luego suprime la expresión de sus ARNm diana mediante una unión específica (38). Los fármacos basados en el ARNsi utilizan esta misma maquinaria para ejercer un efecto similar (34). Todos ellos se consideran de la categoría de inhibidores de la expresión génica, ya que o bien inducen la degradación del ARN o bien inhiben la traducción (35).

Patisiran es el primer fármaco de ARNsi aprobado por la FDA en 2018. Se trata de un medicamente efectivo para la amiloidosis hereditaria por transtiretina, una enfermedad genética degenerativa y letal. (34).

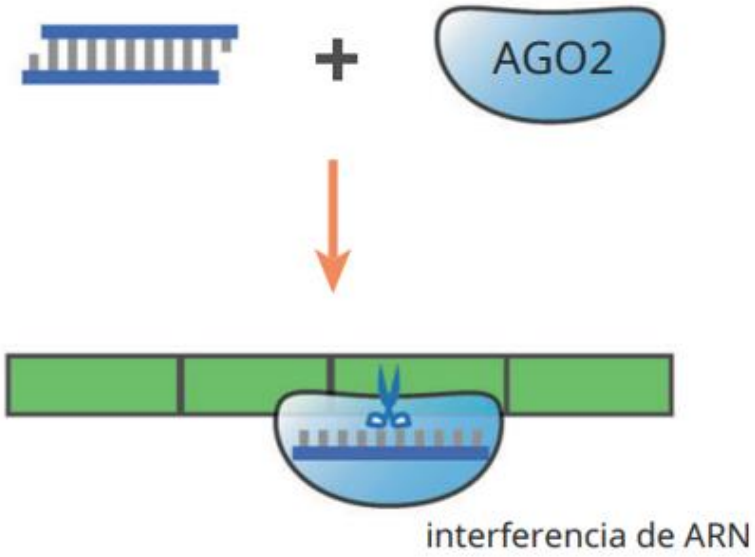

Figura 4. Mecanismo de acción de los ARNsi

Aptámeros

Los aptámeros son ácidos nucleicos monocatenarios cortos que pueden unirse a una variedad de dianas, como proteínas, péptidos, carbohidratos y otras moléculas, gracias a su estructura terciaria, en lugar de a su secuencia, y modular su función. Los aptámeros se unen a las dianas con alta especificidad y afinidad, y pueden servir como

agonistas, antagonistas, aptámeros biespecíficos e incluso portadores de otros fármacos (39). El único aptámero aprobado por la FDA hasta la fecha es el Pegaptanib, desarrollado para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (35).

Terapias basadas en ARNm

Se trata de ARNms sintetizados mediante trascripción *in vitro*, a los que se les añade un análogo de *cap* a su extremo 5' para facilitar su reconocimiento por parte de la maquinaria de traducción de la célula (40). Las terapias basadas en ARNm se pueden dividir en dos amplias subcategorías en función de su propósito, por un lado, el reemplazo o complementación de proteínas endógenas, como es el caso de las terapias que rescatan la actividad de enzimas deficitarias, y por otro, aquellas terapias en las que el ARNm actúa como vacuna contra enfermedades infecciosas o cáncer (41, 42). En las vacunas contra el SARS-COV2, con las que se logró combatir la pandemia en tiempo récord, el ARNm exógeno instruye a las células del cuerpo sobre cómo producir una proteína que desencadena una respuesta inmunitaria contra el virus (34).

4.1.3. VENTAJAS DE LAS TERAPIAS ESPECÍFICAS DE ARN

Las terapias basadas en ARN presentan numerosas ventajas frente a tecnologías más convencionales, como es por ejemplo el hecho de que, al ser específicas para una secuencia concreta, pueden dirigirse contra prácticamente cualquier componente genético del interior celular y contra cualquier molécula no susceptibles de tratamiento que, de otro modo, serían difíciles de atacar con fármacos basados en moléculas pequeñas. A partir de una estimación, una quinta parte de las proteínas pueden ser atacadas por medicamentos de uso común, incluidas moléculas pequeñas y anticuerpos (43). Su desarrollo rápido y rentable, en comparación con el de moléculas pequeñas o proteínas recombinantes y la capacidad de alterar rápidamente la secuencia de la construcción de ARNm para tratamientos personalizados o para adaptarse a un patógeno en evolución es también una ventaja frente a las terapias convencionales. Además, gracias a las modificaciones introducidas en su síntesis, sus efectos pueden ser

estables a largo plazo, y no presentan riesgos significativos genotóxicos comparados con las terapias basadas en ADN (34).

Por otro lado, gracias a la versatilidad de estas terapias, una vez establecidas las vías de administración y la química específica, el coste para desarrollar estos fármacos es cada vez menor, lo que ya está permitiendo desarrollar terapias personalizadas específicas para enfermedades muy raras (44).

La liberación del fármaco a un órgano concreto puede ser necesaria para determinadas patologías. Las nanopartículas lipídicas son trasportadas y eliminadas por el hígado y los riñones, por lo que muchas de las terapias actuales basadas en ARN se dirigen a enfermedades que afectan a estos órganos, por lo que los esfuerzos actuales deben encaminarse a facilitar la administración o liberación a otros órganos y tipos celulares (45).

4.2. ANÁLISIS *IN SILICO*

Las mutaciones exónicas y de *splicing* en el gen *TRPM6* relacionadas clínicamente con la HSH seleccionadas fueron sometidas a análisis bioinformático para valorar su grado de patogenicidad y su efecto potencial en el *splicing*. (resultados en la tabla 2). Todas ellas fueron designadas como patogénicas o potencialmente dañinas por al menos 3 de los programas utilizados, salvo la variante de cambio de sentido p.H584R (c.1751A>G). En cuanto a su efecto potencial en el *splicing*, la herramienta HSF consideró sin impacto (verde) 7 de las variantes, con probabilidad de impacto baja (amarillo) 12 mutaciones, con probabilidad de impacto moderada (naranja) 1 variante, y con probabilidad de impacto alta (rojo), 16. De estas, 1 es la variante de cambio de sentido p.K436R (c.1307A>G), y otra es la única variante sinónima incluida en el análisis, p.T846= (c.2538G>A). Esta última es llamativa ya que al no producir un cambio de aminoácido se consideraría una mutación neutra. Las 14 restantes son las mutaciones intrónicas clasificadas como mutaciones de *splicing* en la base de datos HGMD. Todas las variantes que predicen un elevado impacto en el procesamiento de *splicing* producen la pérdida de la secuencia reguladora aceptora o donadora del correspondiente exón. Esto, de reproducirse a nivel funcional, conllevaría el no reconocimiento del exón correspondiente y, por tanto, su exclusión, total o parcial, del tránscrito final o, por el

contrario, la inclusión en el tránscrito final de regiones intrónicas. Estos tránscritos aberrantes pueden ser degradados por la maquinaria celular, y por tanto no producirse proteína en absoluto, o dar lugar a síntesis de proteínas incompletas y/o defectuosas.

ACCESO	MUTACIÓN HGMD	HGVS	EXÓN/ INTRÓN	EFECTO	FENOTIPO	REFERENCIA	PATOGENICIDAD				HSF	
							SIFT	PolyPhen2	Mutation taster	CADD Score	Elementos de *splicing*	Secuencias auxiliares
CM158864	CAT-AAT His61Asn	c.181C>A p.H61N	E4	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Astor (2015) Endocr. Connect 4:215	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	16.84	Sin impacto	
CM1920673	GAT-GGT Asp93Gly	c.278A>G p.D93G	E4	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia	Hureaux (2019) Kidney Int 96:1408	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	24.8	Nuevo donador (δ=48.96%)	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-3)
CM021155	TCA-TTA Ser141Leu	c.422C>T p.S141L	E5	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Schlingmann (2002) Nat Genet 31:166	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	33	Sin impacto	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-5)
CM060086	ATA-AGA Ile174Arg	c.521T>G p.I174R	E5	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Jalkanen (2006) Eur J Hum Genet 14:55	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	26.4	Sin impacto	
CM060087	ACT-CCT Thr354Pro	c.1060A>C p.T354P	E9	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Jalkanen (2006) Eur J Hum Genet 14:55	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	POLIMORFISMO	25	Sin impacto	
CM1620681	AAG-AGG Lys436Arg	c.1307A>G p.K436R	E11	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Tej (2016) Open J Pediatr 6:290	NO DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	22.2	Donador salvaje alterado (δ=-59.65%)	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-4)
CM2026060	TAC-TGC Tyr479Cys	c.1436A>G p.Y479C	E12	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia 1, Intestinal	Seo (2020) Clin Genet 98:562	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	26.2	Sin impacto	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-5)
CM212120	CAT-CGT His584Arg	c.1751A>G p.H584R	E16	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Bayramoğlu (2021) J Clin Res Pediatr Endocrinol	NO DAÑINA	BENIGNA	Posiblemente PATOGÉNICA	7.022	Nuevo donador (δ=60.47%)	Sin impacto
CM060089	TGC-TAC Cys707Tyr	c.2120G>A p.C707Y	E17	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Jalkanen (2006) Eur J Hum Genet 14:55	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	26.1	Sin impacto	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-3)
CM142257	CTT-CCT Leu708Pro	c.2123T>C p.L708P	E17	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Lainez (2014) Eur J Hum Genet 22:497	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	27.6	Sin impacto	
CM2118977	ACGACA Thr846Thr	c.2538G>A p.T846=	E19	SINÓNIMA	Hipomagnesemia 1, Intestinal	Acar (2021) J Pediatr Endocrinol Metab 34:1481	ND	ND	ND	ND	Donador salvaje alterado (δ=-12.55%)	Sin impacto
CM142258	GAG-GGG Glu872Gly	c.2615A>G p.E872G	E20	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Lainez (2014) Eur J Hum Genet 22:497	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	28.5	Nuevo donador (δ=16.09%)	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-8)
CM158861	TTC-TTG Phe978Leu	c.2934C>G p.F978L	E22	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Astor (2015) Endocr Connect 4:215 PubMed 26273099	NO DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	24.3	Nuevo donador (δ=70.11%)	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-6)

ACCESO	MUTACIÓN HGMD	HGVS	EXÓN/ INTRÓN	EFECTO	FENOTIPO	REFERENCIA	PATOGENICIDAD				HSF	
							SIFT	PolyPhen2	Mutation taster	CADD Score	Elementos de *splicing*	Secuencias auxiliares
CM071116	CCA-CGA Pro1017Arg	c.3050C>G p.P1017R	E22	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Chubanov (2007) J Biol Chem 282:7656	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	26.6	Sin impacto	
CM158862	GGT-GTT Gly1042Val	c.3125G>T p.G1042V	E23	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Astor (2015) Endocr Connect 4:215 PubMed 26273099	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	28.2	Sin impacto	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-6)
CM142254	TAC-TGC Tyr1053Cys	c.3158A>G p.Y1053C	E23	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Lainez (2014) Eur J Hum Genet 22:497	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	26.8	Nuevo donador (δ=17%)	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-6)
CM2011307	ATC-AAC Ile1060Asn	c.3179T>A p.I1060N	E23	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Lomelino-Pinheiro (2020) Endocrinol Diabetes Metab Case Rep 2020:20-0005	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	30	Sin impacto	
CM194682	ATC-TTC Ile1060Phe	c.3178A>T p.I1060F	E23	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipotonía con convulsiones	Özlü (2019) Pediatr Nephrol 34:1729	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	29.4	Sin impacto	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-2)
CM1915847	AAG-GAG Lys1098Glu	c.3292A>G p.K1098E	E24	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia	Willows (2019) F1000Res 8	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	27.3	Sin impacto	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-2)
CM1914167	CCT-CTT Pro1104Leu	c.3311C>T p.P1104L	E24	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 36:805	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	23.6	Sin impacto	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-2)
CM142252	CTG-CCG Leu1143Pro	c.3428T>C p.L1143P	E25	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Lainez (2014) Euro J Hum Genet 22:497	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	28.5	Sin impacto	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-2)
CM142255	AGC-AAC Ser1754Asn	c.5261G>A p.S1754N	E34	CAMBIO DE SENTIDO (*missense*)	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Lainez (2014) Eur J Hum Genet 22:497	DAÑINA	Posiblemente DAÑINA	PATOGÉNICA	32	Sin impacto	
CS212119	IVS7 ds G-A +1	c.841+1G>A	I7	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Bayramoğlu (2021) J Clin Res Pediatr Endocrinol	ND	ND	ND	ND	Donador salvaje alterado (δ=-34.48%)	Sin impacto
CS025232	IVS8 ds G-C +5	c.1010+5G>C	I8	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Walder (2002) Nat Genet 31:171	ND	ND	ND	ND	Donador salvaje alterado (δ=-11.02%)	Sin impacto
CS060110	IVS9 ds G-C +5	c.1134+5G>C	I9	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Jalkanen (2006) Eur J Hum Genet 14:55	ND	ND	ND	ND	Donador salvaje alterado (δ=-12.68%)	Sin impacto
CS056776	IVS10 as G-A -1	c.1208-1G>A	I10	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Schlingmann (2005) J Am Soc Nephrol 16:3061	ND	ND	ND	ND	Aceptor salvaje alterado (δ=-32.73%)	Sin impacto

ACCESO	MUTACIÓN HGMD	HGVS	EXÓN/ INTRÓN	EFECTO	FENOTIPO	REFERENCIA	PATOGENICIDAD				HSF	
							SIFT	PolyPhen2	Mutation taster	CADD Score	Elementos de *splicing*	Secuencias auxiliares
CS056777	IVS11 ds G-A +1	c.1308+1G>A	I11	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Schlingmann (2005) J Am Soc Nephrol 16:3061	ND	ND	ND	ND	Donador salvaje alterado (δ=-33.71%)	Sin impacto
CS114792	IVS12 as G-T -1	c.1444-1G>T	I12	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Guran (2012) Nephrol Dial Transplant 27:667	ND	ND	ND	ND	Aceptor salvaje alterado (δ=-30.49%)	Sin impacto
CS021180	IVS16 ds G-A +1	c.2009+1G>A	I16	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Walder (2002) Nat Genet 31:171	ND	ND	ND	ND	Donador salvaje alterado (δ=-30.23%)	Sin impacto
CS142253	IVS18 ds T-G +2	c.2391+2T>G	I18	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Lainez (2014) Eur J Hum Genet 22:497	ND	ND	ND	ND	Donador salvaje alterado (δ=-31.22%)	Sin impacto
CS056778	IVS19 as A-T -2	c.2539-2A>T	I19	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Schlingmann (2005) J Am Soc Nephrol 16:3061	ND	ND	ND	ND	Aceptor salvaje alterado (δ=-32.48%)	Sin impacto
CS021181	IVS20 ds G-A +1	c.2667+1G>A	I20	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Schlingmann (2002) Nat Genet 31:166	ND	ND	ND	ND	Donador salvaje alterado (δ=-28.26%)	Sin impacto
CS021182	IVS25 as G-A -1	c.3537-1G>A	I25	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Schlingmann (2002) Nat Genet 31:166	ND	ND	ND	ND	Aceptor salvaje alterado (δ=-34.84%)	Sin impacto
CS056781	IVS30 ds T-C +2	c.5057+2T>C	I30	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Schlingmann (2005) J Am Soc Nephrol 16:3061	ND	ND	ND	ND	Donador salvaje alterado (δ=-33.73%)	Sin impacto
CS142256	IVS31 as A-G -2	c.5084-2A>G	I31	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Lainez (2014) Eur J Hum Genet 22:497	ND	ND	ND	ND	Aceptor salvaje alterado (δ=-32.31%)	Sin impacto
CS056782	IVS36 ds A-G -2	c.5775A>G	I36	SPLICING	Hipomagnesemia con hipocalcemia secundaria	Schlingmann (2005) J Am Soc Nephrol 16:3061	ND	ND	ND	ND	Donador salvaje alterado (δ=-48.81%)	Alteración del equilibrio ESE/ESS (-4)

Tabla 2. Análisis in silico de la patogenicidad y efecto potencial en el *splicing* de mutaciones causantes de HSH en el gen *TRPM6*, (HSF: Human Splicing Finder. ND: No determinado). En verde se muestran las mutaciones sin impacto en el *splicing*, en amarillo las de probabilidad baja, en naranja las de probabilidad moderada y en rojo, las de alta probabilidad

5. DISCUSIÓN

Nuestro análisis *in silico* de mutaciones causantes de HSH mostró que las mutaciones exónicas de cambio de sentido p.K436R (c.1307A>G) y la sinónima, p.T846= (c.2538G>A), además de todas las intrónicas causantes de HSH, podrían estar afectando al proceso de *splicing*, impidiendo el reconocimiento por parte del espliceosoma del sitio donador o el aceptor. Este posible efecto debería confirmarse tanto mediante el análisis de los patrones de expresión en el ARN de los pacientes como mediante el estudio de las consecuencias a nivel de proteína TRPM6 funcional, a partir de muestras biológicas. De confirmarse la alteración, estas mutaciones serían candidatas para intervención mediante terapias basadas en ARN. Un ASO dirigido a un sitio aceptor o donador alterado podría redirigir al espliceosoma hacia el reconocimiento de otro sitio adyacente o estabilizar elementos reguladores próximos, permitiendo que se genere un tránscrito que pueda posteriormente ser traducido en una proteína funcional o parcialmente funcional, como sucede en el caso de Spinraza. Por otro lado, una estrategia terapéutica basada en ARNm permitiría producir en el interior celular una proteína TRPM6 funcional exógena, tal y como sucede con las vacunas contra el SARS-COV2.

El número de moléculas en desarrollo y de ensayos clínicos ha aumentado en los últimos años por lo que se espera que surjan nuevos medicamentos basados en ARN para tratar enfermedades que hasta el momento carecen de tratamiento específico, como son la mayoría de las enfermedades raras, incluyendo la HSH. El desarrollo de fármacos individualizados efectivos para un único paciente es un desafío, a no ser que los beneficios sean inequívocos (27); afortunadamente, si bien diversas compañías biofarmacéuticas han adquirido un papel dominante en el desarrollo del sector en los últimos años, también existe un incremento en programas desarrollados a nivel hospitalario que buscan acelerar la traslación de terapias personalizadas basadas en ARN desde el laboratorio al paciente (39).

6. CONCLUSIONES

Las terapias basadas en ARN podrían ser una opción prometedora para el tratamiento de la HSH cuando está causada por mutaciones que afectan al procesamiento del ARNm o a la síntesis de una proteína TRPM6 funcional.

La aplicación de estas terapias a la HSH, así como a otras enfermedades raras, pasará por estudios del defecto concreto que presenta cada paciente y el desarrollo de estrategias y fármacos personalizados.

El desarrollo de fármacos basados en ARN es un campo de rápido desarrollo y de gran potencial, que con toda probabilidad cambiará los estándares de cómo abordamos el tratamiento de las enfermedades raras, como la HSH.

7. BIBLIOGRAFIA

(1) Magnesio en la dieta_ MedlinePlus enciclopedia médica. Disponible en: https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002423.htm

(2) Azim MK, Mehnaz A, Ahmed JZ, Mujtaba G. Exome sequencing identifies a novel frameshift variant causing hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. CEN Case Rep [Internet]. 2019;8(1):42–7. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s13730-018-0362-x

(3) Lewis JL III. Hipomagnesemia [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. Disponible en: https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/trastornos-endocrinol%C3%B3gicos-y-metab%C3%B3licos/trastornos-electrol%C3%ADticos/hipomagnesemia

(4) Chubanov V, Schlingmann KP, Wäring J, Heinzinger J, Kaske S, Waldegger S, et al. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia due to a missense mutation in the putative pore-forming region of TRPM6. J Biol Chem [Internet]. 2007;282(10):7656–67. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M611117200

(5) Lainez S, Schlingmann KP, van der Wijst J, Dworniczak B, van Zeeland F, Konrad M, et al. New TRPM6 missense mutations linked to hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. Eur J Hum Genet [Internet]. 2014;22(4):497–504. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2013.178

(6) Baaij D, Hoenderop JH, Bindels JG. Magnesium in man: implications for health and disease. Physiol Rev. 2015;95:1–46.

(7) Quamme GA, Schlingmann KP, Konrad M. CHAPTER 61 - Mechanisms and Disorders of Magnesium Metabolism. In: ALPERN RJ, HEBERT SC, editors. Seldin and Giebisch's The Kidney (Fourth Edition) San Diego: Academic Press; 2008. p. 1747-1767.

(8) Zhao Z, Pei Y, Huang X, Liu Y, Yang W, Sun J, et al. Novel *TRPM6* mutations in familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. Am J Nephrol [Internet]. 2013;37(6):541–8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1159/000350886

(9) Chubanov V, Gudermann T. TRPM6. Handb Exp Pharmacol [Internet]. 2014;222:503–20. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_20

(10) HGMD® home page [Internet]. Cf.ac.uk. Disponible en: http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php

(11) Mollocana-Lara EC, Ni M, Agathos SN, Gonzales-Zubiate FA. The infinite possibilities of RNA therapeutics. J Ind Microbiol Biotechnol [Internet]. 2021;48(9–10). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/jimb/kuab063

(12) Claverie-Martin F, Gonzalez-Paredes FJ, Ramos-Trujillo E. Splicing defects caused by exonic mutations in PKD1 as a new mechanism of pathogenesis in autosomal

dominant polycystic kidney disease. RNA Biol [Internet]. 2015;12(4):369–74. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/15476286.2015.1014291

(13) Matlin AJ, Clark F, Smith CWJ. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2005;6(5):386–98. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nrm1645

(14) Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nat Rev Genet [Internet]. 2002;3(4):285–98. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nrg775

(15) Fairbrother WG, Holste D, Burge CB, Sharp PA. Single nucleotide polymorphism-based validation of exonic splicing enhancers. PLoS Biol [Internet]. 2004;2(9):E268. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020268

(16) Kan JL, Green MR. Pre-mRNA splicing of IgM exons M1 and M2 is directed by a juxtaposed splicing enhancer and inhibitor. Genes Dev [Internet]. 1999;13(4):462–71. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1101/gad.13.4.462

(17) Wagner EJ, Garcia-Blanco MA. RNAi-mediated PTB depletion leads to enhanced exon definition. Mol Cell [Internet]. 2002;10(4):943–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00645-7

(18) Buratti E, Baralle M, Baralle FE. Defective splicing, disease and therapy: searching for master checkpoints in exon definition. Nucleic Acids Res [Internet]. 2006;34(12):3494–510. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl498

(19) Ramos-Trujillo E, González-Acosta H, Flores C, García-Nieto V, Guillén E, Gracia S, et al. A missense mutation in the chloride/proton ClC-5 antiporter gene results in increased expression of an alternative mRNA form that lacks exons 10 and 11. Identification of seven new CLCN5 mutations in patients with Dent's disease. J Hum Genet [Internet]. 2007;52(3):255–61. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s10038-007-0112-y

(20) Campos B, Díez O, Domènech M, Baena M, Balmaña J, Sanz J, et al. RNA analysis of eight BRCA1 and BRCA2 unclassified variants identified in breast/ovarian cancer families from Spain: MUTATIONS IN BRIEF. Hum Mutat [Internet]. 2003;22(4):337. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/humu.9176

(21) Drögemüller C, Reichart U, Seuberlich T, Oevermann A, Baumgartner M, Kühni Boghenbor K, et al. An unusual splice defect in the mitofusin 2 gene (MFN2) is associated with degenerative axonopathy in Tyrolean Grey cattle. PLoS One [Internet]. 2011;6(4):e18931. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018931

(22) Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtukova I, Zhang L, Mayr C, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. Nature [Internet]. 2008;456(7221):470–6. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nature07509

(23) Nicholson P, Yepiskoposyan H, Metze S, Zamudio Orozco R, Kleinschmidt N, Mühlemann O. Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2010;67(5):677–700. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0177-1

(24) Fu X-D. Non-coding RNA: a new frontier in regulatory biology. Natl Sci Rev [Internet]. 2014;1(2):190–204. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/nsr/nwu008

(25) Winkle M, El-Daly SM, Fabbri M, Calin GA. Noncoding RNA therapeutics - challenges and potential solutions. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2021;20(8):629–51. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s41573-021-00219-z

(26) Feng R, Patil S, Zhao X, Miao Z, Qian A. RNA therapeutics - research and clinical advancements. Front Mol Biosci [Internet]. 2021;8:710738. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2021.710738

(27) Drew L. Why rare genetic diseases are a logical focus for RNA therapies. Nature [Internet]. 2019;574(7778):S16–8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/d41586-019-03075-5

(28) DeWeerdt S. RNA therapies explained. Nature [Internet]. 2019;574(7778):S2–3. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/d41586-019-03068-4

(29) Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Béroud G, Claustres M, Béroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. Nucleic Acids Res [Internet]. 2009;37(9):e67. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp215

(30) Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. Genome Res [Internet]. 2001;11(5):863–74. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1101/gr.176601

(31) Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. Nat Methods [Internet]. 2014;11(4):361–2. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2890

(32) Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods [Internet]. 2010;7(4):248–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0410-248

(33) Rentzsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. CADD-Splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. Genome Med [Internet]. 2021;13(1):31. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s13073-021-00835-9

(34) Kim Y-K. RNA therapy: rich history, various applications and unlimited future prospects. Exp Mol Med [Internet]. 2022;54(4):455–65. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s12276-022-00757-5

(35) Moumné L, Marie A-C, Crouvezier N. Oligonucleotide therapeutics: From discovery and development to patentability. Pharmaceutics [Internet]. 2022;14(2):260. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14020260

(36) Bennett CF. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age. Annu Rev Med [Internet]. 2019;70(1):307–21. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-041217-010829

(37) Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art. Signal Transduct Target Ther [Internet]. 2020;5(1):101. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x

(38) Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2014;15(8):509–24. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nrm3838

(39) Damase TR, Sukhovershin R, Boada C, Taraballi F, Pettigrew RI, Cooke JP. The limitless future of RNA therapeutics. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 2021;9:628137. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2021.628137

(40) Jani B, Fuchs R. In vitro transcription and capping of Gaussia luciferase mRNA followed by HeLa cell transfection. J Vis Exp [Internet]. 2012;(61). Disponible en: http://dx.doi.org/10.3791/3702

(41) Jackson LA, Anderson EJ, Rouphael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 - preliminary report. N Engl J Med [Internet]. 2020;383(20):1920–31. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2022483

(42) Pastor F, Berraondo P, Etxeberria I, Frederick J, Sahin U, Gilboa E, et al. An RNA toolbox for cancer immunotherapy. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2018;17(10):751–67. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2018.132

(43) Kim Y-K. RNA therapy: Current status and future potential. Chonnam Med J [Internet]. 2020;56(2):87–93. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4068/cmj.2020.56.2.87

(44) Kim J, Hu C, Moufawad El Achkar C, Black LE, Douville J, Larson A, et al. Patient-customized oligonucleotide therapy for a rare genetic disease. N Engl J Med [Internet]. 2019;381(17):1644–52. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1813279

(45) Van Haute D, Berlin JM. Challenges in realizing selectivity for nanoparticle biodistribution and clearance: lessons from gold nanoparticles. Ther Deliv [Internet]. 2017;8(9):763–74. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4155/tde-2017-0057

9. ANEXO: MUTACIONES DESCRITAS EN PACIENTES CON HSH (HGMD DATABASE)

Accession	HGMD mutation		HGVS		Variant class	Phenotype	Reference	Source
CM025230	CGA-TGA	Arg56Term	c.166C>T	p.R56*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Walder (2002) *Nat Genet* 31:171	PubMed 12032570
CM158864	CAT-AAT	His61Asn	c.181C>A	p.H61N	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Astor (2015) *Endocr Connect* 4:215	PubMed 26273099
CM1920673	GAT-GGT	Asp93Gly	c.278A>G	p.D93G	DM	Hypomagnesaemia	Hureaux (2019) *Kidney Int* 96:1408	PubMed 31672324
CM021155	TCA-TTA	Ser141Leu	c.422C>T	p.S141L	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Schlingmann (2002) *Nat Genet* 31:166	PubMed 12032568
CM056711	GAG-TAG	Glu157Term	c.469G>T	p.E157*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Schlingmann (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:3061	PubMed 16107578
CM060086	ATA-AGA	Ile174Arg	c.521T>G	p.I174R	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Jalkanen (2006) *Eur J Hum Genet* 14:55	PubMed 16267500
CM060087	ACT-CCT	Thr354Pro	c.1060A>C	p.T354P	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Jalkanen (2006) *Eur J Hum Genet* 14:55	PubMed 16267500
CM1620681	AAG-AGG	Lys436Arg	c.1307A>G	p.K436R	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Tej (2016) *Open J Pediatr* 6:290	PubMed: No PubMed ID
CM024153	CGA-TGA	Arg474Term	c.1420C>T	p.R474*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Walder (2002) *Nat Genet* 31:171	PubMed 12032570
CM2026060	TAC-TGC	Tyr479Cys	c.1436A>G	p.Y479C	DM	Hypomagnesemia 1, intestinal	Seo (2020) *Clin Genet* 98:562	PubMed 32901917
CM060088	TAC-TAA	Tyr479Term	c.1437C>A	p.Y479*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Jalkanen (2006) *Eur J Hum Genet* 14:55	PubMed 16267500
CM193690	CAA-TAA	Gln495Term	c.1483C>T	p.Q495*	DM	Hypomagnesaemia	Goda (2019) *Hum Genome Var* 6:13	PubMed 30911400
CM212120	CAT-CGT	His584Arg	c.1751A>G	p.H584R	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Bayramoğlu (2021) *J Clin Res Pediatr Endocrinol* :	PubMed 33565749
CM021156	TCA-TGA	Ser590Term	c.1769C>G	p.S590*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Schlingmann (2002) *Nat Genet* 31:166	PubMed 12032568
CM1512201	CAG-TAG	Gln621Term	c.1861C>T	p.Q621*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Coulter (2015) *J Pediatr Endocrinol Metab* 28:1373	PubMed 26226117
CM1416471	GCG-GAG	Ala641Glu	c.1922C>A	p.A641E	DM?	Autism spectrum disorder	Iossifov (2014) *Nature* 515:216	PubMed 25363768
CM060089	TGC-TAC	Cys707Tyr	c.2120G>A	p.C707Y	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Jalkanen (2006) *Eur J Hum Genet* 14:55	PubMed 16267500
CM142257	CTT-CCT	Leu708Pro	c.2123T>C	p.L708P	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Lainez (2014) *Eur J Hum Genet* 22:497	PubMed 23942199
CM1930074	GGT-GGC	Gly817Gly	c.2451T>C	p.G817=	DM?	Autism	Turner (2019) *Am J Hum Genet* 105:1274	PubMed 31785789
CM1613783	TGG-TAG	Trp827Term	c.2480G>A	p.W827*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia & myoclonic epilepsy	Kekatpure (2016) *Neurol India* 64:1037	PubMed 27625251
CM2118977	ACG-ACA	Thr846Thr	c.2538G>A	p.T846=	DM	Hypomagnesemia 1, intestinal	Acar (2021) *J Pediatr Endocrinol Metab* 34:1481	PubMed 34261199
CM142258	GAG-GGG	Glu872Gly	c.2615A>G	p.E872G	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Lainez (2014) *Eur J Hum Genet* 22:497	PubMed 23942199
CM056712	CGA-	Arg928Term	c.2782C>T	p.R928*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Schlingmann (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:3061	PubMed 16107578

	TGA							
CM158861	TTC-TTG	Phe978Leu	c.2934C>G	p.F978L	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Astor (2015) *Endocr Connect* 4:215	PubMed 26273099
CM071116	CCA-CGA	Pro1017Arg	c.3050C>G	p.P1017R	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Chubanov (2007) *J Biol Chem* 282:7656	PubMed 17197439
CM190194	TCA-TAA	Ser1034Term	c.3101C>A	p.S1034*	DM	Intellectual disability	Kahrizi (2019) *Clin Genet* 95:151	PubMed 30315573
CM158862	GGT-GTT	Gly1042Val	c.3125G>T	p.G1042V	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Astor (2015) *Endocr Connect* 4:215	PubMed 26273099
CM142254	TAC-TGC	Tyr1053Cys	c.3158A>G	p.Y1053C	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Lainez (2014) *Eur J Hum Genet* 22:497	PubMed 23942199
CM2011307	ATC-AAC	Ile1060Asn	c.3179T>A	p.I1060N	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Lomelino-Pinheiro (2020) *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep* 2020:20-0005	PubMed 32369769
CM194682	ATC-TTC	Ile1060Phe	c.3178A>T	p.I1060F	DM	Hypotonia & seizures	Özlü (2019) *Pediatr Nephrol* 34:1729	PubMed 30903374
CM1915847	AAG-GAG	Lys1098Glu	c.3292A>G	p.K1098E	DM	Hypomagnesaemia	Willows (2019) *F1000Res* 8:	PubMed 31448104
CM1914167	CCT-CTT	Pro1104Leu	c.3311C>T	p.P1104L	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Tan (2019) *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 36:805	PubMed 31400133
CM142252	CTG-CCG	Leu1143Pro	c.3428T>C	p.L1143P	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Lainez (2014) *Eur J Hum Genet* 22:497	PubMed 23942199
CM158863	GAA-TAA	Glu1155Term	c.3463G>T	p.E1155*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Astor (2015) *Endocr Connect* 4:215	PubMed 26273099
CM212121	CGA-TGA	Arg1172Term	c.3514C>T	p.R1172*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Bayramoğlu (2021) *J Clin Res Pediatr Endocrinol* :	PubMed 33565749
CM114789	CAG-TAG	Gln1186Term	c.3556C>T	p.Q1186*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Guran (2012) *Nephrol Dial Transplant* 27:667	PubMed 21669885
CM1211834	TGG-TAG	Trp1397Term	c.4190G>A	p.W1397*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Katayama (2015) *Brain Dev* 37:292	PubMed 24985022
CM134756	TGG-TAG	Trp1526Term	c.4577G>A	p.W1526*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Zhao (2013) *Am J Nephrol* 37:541	PubMed 23689795
CM2123891	GAG-TAG	Glu1547Term	c.4639G>T	p.E1547*	DM	Head and neck squamous cell carcinoma	Cury (2021) *Oral Oncol* 122:	PubMed 34598035
CM220650	TGG-TGA	Trp1570Term	Not yet available	Not yet available	DM	Hypomagnesemia 1, intestinal	Bournazos (2022) *Genet Med* 24:130	PubMed 34906502
CM142255	AGC-AAC	Ser1754Asn	c.5261G>A	p.S1754N	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Lainez (2014) *Eur J Hum Genet* 22:497	PubMed 23942199
CM1417529	CGA-TGA	Arg1772Term	c.5314C>T	p.R1772*	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Shimizu (2014) *Pediatr Nephrol* 29:1951, 1953	PubMed 24030239
CM1620895	TTA-TAA	Leu1922Term	c.5765T>A	p.L1922*	DM?	Autism	Yuen (2016) *NPJ Genom Med* 1:160271	PubMed 27525107
CM1416470	ACG-CCG	Thr2011Pro	c.6031A>C	p.T2011P	DM?	Autism spectrum disorder	Iossifov (2014) *Nature* 515:216	PubMed 25363768

Accession	HGMD splicing mutation	HGVS	Variant class	Phenotype	Reference	Source
CS212119	IVS7 ds G-A +1	c.841+1G>A	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Bayramoğlu (2021) *J Clin Res Pediatr Endocrinol* :	PubMed 33565749
CS025232	IVS8 ds G-C +5	c.1010+5G>C	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Walder (2002) *Nat Genet* 31:171	PubMed 12032570
CS060110	IVS9 ds G-C +5	c.1134+5G>C	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Jalkanen (2006) *Eur J Hum Genet* 14:55	PubMed 16267500
CS056776	IVS10 as G-A -1	c.1208-1G>A	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Schlingmann (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:3061	PubMed 16107578
CS056777	IVS11 ds G-A +1	c.1308+1G>A	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Schlingmann (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:3061	PubMed 16107578
CS220702	IVS11 ds T-G +7	Not yet available	DM	Hypomagnesemia 1, intestinal	Bournazos (2022) *Genet Med* 24:130	PubMed 34906502
CS114792	IVS12 as G-T -1	c.1444-1G>T	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Guran (2012) *Nephrol Dial Transplant* 27:667	PubMed 21669885
CS021180	IVS16 ds G-A +1	c.2009+1G>A	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Walder (2002) *Nat Genet* 31:171	PubMed 12032570
CS142253	IVS18 ds T-G +2	c.2391+2T>G	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Lainez (2014) *Eur J Hum Genet* 22:497	PubMed 23942199
CS056778	IVS19 as A-T -2	c.2539-2A>T	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Schlingmann (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:3061	PubMed 16107578
CS021181	IVS20 ds G-A +1	c.2667+1G>A	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Schlingmann (2002) *Nat Genet* 31:166	PubMed 12032568
CS025231	IVS23 as A-G -68	Not yet available	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Walder (2002) *Nat Genet* 31:171	PubMed 12032570
CS021182	IVS25 as G-A -1	c.3537-1G>A	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Schlingmann (2002) *Nat Genet* 31:166	PubMed 12032568
CS056781	IVS30 ds T-C +2	c.5057+2T>C	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Schlingmann (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:3061	PubMed 16107578
CS142256	IVS31 as A-G -2	c.5084-2A>G	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Lainez (2014) *Eur J Hum Genet* 22:497	PubMed 23942199
CS056782	IVS36 ds A-G -2	c.5775A>G	DM	Hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia	Schlingmann (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:3061	PubMed 16107578