



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de fin de Carrera titulado:

Cuantificación *in silico* de isoformas de MSI2 en modelos de distrofia miotónica tipo I y posibles off-targets de tratamientos con gapmers.

Realizado por:

MOREANO SOTOMAYOR JORGE LUIS

Director del proyecto:

ESPINOSA ESPINOSA JORGE PATRICIO

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

QUITO, 23 de marzo del 2025

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, MOREANO SOTOMAYOR JORGE LUIS, ecuatoriano, con Cédula de ciudadanía N° 1751616507, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

A través de esta declaración, cedo los derechos de propiedad intelectual a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y normativa institucional vigente.



Moreano Sotomayor Jorge Luis

C.I.: 1751616507

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

PhD. Espinosa Espinosa Jorge Patricio

LOS PROFESORES INFORMANTES:

GUTIERREZ BRAVO MARIA FERNANDA

HERRERA YELA MANUEL ANDRÉS

Después de revisar el trabajo presentado lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador.

Dra. Gutiérrez Bravo María Fernanda

MSc. Herrera Yela Manuel Andrés

Quito, 23 de marzo de 2025

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.



Moreano Sotomayor Jorge Luis

C.I.: 1751616507

Artículo de tesis

Cuantificación *in silico* de isoformas de MSI2 en modelos de distrofia miotónica tipo I y posibles off-targets de tratamientos con gapmers.

Jorge Luis Moreano – Sotomayor¹, Jorge Patricio Espinosa – Espinosa^{2, 3, 4, 5}

1. Master's Degree in Biomedicine, Health Sciences Faculty, Universidad Internacional SEK (UISEK), Quito 170302, Ecuador; jorge.moreano@uisek.edu.ec
2. INCLIVA Biomedical Research Institute, Avenue Menéndez Pelayo 4 acc. 46010 Valencia, Spain.
3. ARTHEx Biotech, Parque Científico de la Universidad de Valencia. Calle del Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 9, 46980 Paterna, Valencia, Spain.
4. Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), CB23/07/00005, Carlos III Health Institute, 28029 Madrid, Spain.
5. Experimental and Applied Biomedicine Research Group, Health Sciences Faculty, Universidad Particular Internacional SEK (UISEK), Quito 170302, Ecuador; jorge.espinosae@uisek.edu.ec

Resumen: La distrofia miotónica tipo 1 (DM1) es una enfermedad hereditaria progresiva neuromuscular con afectación multisistémica que puede manifestarse en recién nacidos y adultos mayores, ocasionando discapacidades y reduciendo la esperanza de vida. Se origina por la expansión de repeticiones del trinucleótido CTG en el gen *DMPK*, que resulta en la generación de transcritos defectuosos con horquillas tóxicas que secuestran a la proteína MBNL, impidiendo su unión a otros transcritos, y permitiendo que CELF1 se active, lo que contribuye a la formación de transcritos anómalos. Esto altera el equilibrio de otras proteínas como MSI2, que se sobreexpresa e inhibe la biogénesis de miR-7, contribuyendo al desarrollo de DM1 y cáncer. Debido a la alta heterogeneidad clínica y baja prevalencia de DM1, sus estudios son escasos e inconcluyentes, por lo que no se ha podido establecer tratamientos efectivos aún. Por ello, en este estudio aborda el uso de oligonucleótidos antisentido (gapmers) dirigidos a la secuencia de MSI2 en biopsias de humanos, ratones y líneas celulares de repositorios públicos. La identificación de variaciones en la expresión de las isoformas alteradas y controles sanos se llevó a cabo con DeSeq2 encontrando 284 isoformas significativamente alteradas comunes entre musculo esquelético y modelos celulares. Las isoformas de MSI2 alteradas con mayor expresión fueron modeladas tridimensionalmente con AlphaFold y comparadas estructuralmente con PyMOL. Finalmente, se evaluó la complementariedad de un ASO diseñado contra MSI2 identificando una complementariedad del 92.3% utilizando RhoDesign, además se evaluó un control negativo (SC) el cual no presentó complementariedad con MSI2, pero sí con otros transcritos. Los hallazgos confirman que el ASO cumple su función a nivel estructural e identifica el exón de unión complementario de MSI2 asociadas a DM1 y su posible funcionamiento como estrategia terapéutica.

Palabras clave: Oligonucleótidos antisentido; Gen *DMPK*; Expansión del trinucleótido CTG; Expresión diferencial; Estrategia terapéutica; Variabilidad de expresión; Proteínas RBP; Herramientas bioinformáticas; Transcritos defectuosos; Enfermedad hereditaria.

Abstract: Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a progressive hereditary neuromuscular disease with multisystem involvement that can manifest in newborns and older adults, causing disabilities and reduced life expectancy. It is caused by the expansion of CTG trinucleotide repeats in the *DMPK* gene, which results in the generation of defective transcripts with toxic hairpins that hijack the MBNL protein, preventing its binding to other transcripts, and allowing CELF1 to become activated, which contributes to the formation of abnormal transcripts. This alters the balance of other proteins such as MSI2, which is overexpressed and inhibits miR-7 biogenesis, contributing to the development of DM1 and cancer. Due to the high clinical heterogeneity and low prevalence of DM1, its studies are scarce and inconclusive, so it has not

been possible to establish effective treatments yet. Therefore, this study addresses the use of antisense oligonucleotides (gapmers) targeting the MSI2 sequence in human biopsies, mice and cell lines from public repositories. Identification of variations in the expression of altered isoforms and healthy controls was performed with DeSeq2 finding 284 significantly altered isoforms common between skeletal muscle and cellular models. The most highly expressed altered MSI2 isoforms were three-dimensionally modeled with AlphaFold and structurally compared with PyMOL. Finally, the complementarity of an ASO designed against MSI2 was evaluated, identifying a 92.3% complementarity using RhoDesign, and a negative control (SC) was also evaluated, which did not show complementarity with MSI2, but did show complementarity with other transcripts. The findings confirm that the ASO fulfills its function at the structural level and identifies the complementary binding exon of MSI2 associated with DM1 and its possible function as a therapeutic strategy.

Keywords: Antisense oligonucleotides; DMPK gene; CTG trinucleotide expansion; Differential expression; Therapeutic strategy; Expression variability; RBP proteins; Bioinformatics tools; Defective transcripts; Hereditary disease.

1. Introducción

La distrofia miotónica tipo 1 (DM1), conocida también como enfermedad de Steinert, es una enfermedad hereditaria compleja, donde la mayoría de los pacientes experimentan síntomas neuromusculares como miopatía, rigidez muscular, miotonía y atrofia muscular. Además, cumple con un perfil de afectación multisistémica que afecta corazón, cerebro, vías respiratorias e intestino, cuyos efectos se pueden manifestar desde recién nacidos hasta personas mayores, generando discapacidades y con una esperanza de vida reducida (Sabater et al., 2021; 2023).

Esta enfermedad es producida por la expansión patológica del trinucleótido CTG en la región 3' no traducida (3'-UTR) del gen *DMPK* (Smith & Gutman, 2016; Sabater et al., 2021; 2023). Por lo tanto, el ARN mutante en DM1 se asocia con la patogenicidad de los transcritos que se vuelven tóxicos al formar horquillas insolubles U-U, conocidas como focos ribonucleicos que constituyen las estructuras secundarias capaces de retener las proteínas de unión de ARN (RBPs) de la familia Muscleblind Like Splicing Regulator (MBNL) (Jiang et al., 2004; Overby et al., 2022; Moreno et al., 2024). Las proteínas de la familia MBNL, compuesta por MBNL1, MBNL2 y MBNL3, son RBP que cumplen un papel fundamental en la regulación metabólica del ARNm, especialmente en el splicing alternativo y la poliadenilación (Konieczny et al., 2014; Sabater et al., 2023; Moreno et al., 2024).

La expresión de MBNL1 predomina en el músculo esquelético mientras que MBNL2 se encuentra en el cerebro, en donde cada una regula la transición de patrones de expresión genética (Konieczny et al., 2014; Sabater et al., 2023; Yanva et al., 2024). Cuando la proteína MBNL es secuestrada por los focos ribonucleicos, su actividad se ve reducida, lo que impide que cumpla con sus funciones. En su lugar, la RBP CUGBP Elav-Like 1 (CELF1) miembro de la familia se activa y asume el papel de regular el splicing de las transcripciones musculares de ARNm. Esto conduce

a una serie de eventos incorrectos, lo que resulta en la expresión de isoformas inapropiadas de proteínas musculares, resistencia a la insulina, activación de vías cancerígenas, defectos en la regulación del gen CLCN1, una mala regeneración, formación y reparación muscular (Milne & Hodgkin, 1999; Sabater et al., 2023).

Musashi-2 es una RBP presente en las células madre y progenitoras de las células hematopoyéticas. Se desempeña en múltiples procesos biológicos como regulación de la traducción del ARNm, modulación del splicing alternativo y la inhibición de la apoptosis. Su desregulación se asocia con la progresión de cáncer de mama, cerebro, páncreas, hígado, pulmón, colon e incluso leucemia (Matakah et al., 2022; Zhu et al., 2022; Sabater et al., 2023; Zhong et al., 2024). La sobreexpresión de MSI2 inhibe la biogénesis del microARN-7 (miR-7), que actúa regulando la proliferación celular (Choudhury et al., 2013). Sin embargo, cuando miR-7 disminuye, favorece la formación de tumores malignos y fenotipos similares a DM1. Por lo cual, la regulación adecuada de miR-7 es importante para que se efectúe la diferenciación celular y la inhibición de la autofagia excesiva en células de DM1 (Korać et al., 2021; Sabater et al., 2023).

Debido a esto, se están investigando estrategias terapéuticas dirigidas hacia los transcritos expandidos por CUG, como los oligonucleótidos antisentido (ASOs - gapmer) y los antagomiRs. Por un lado, los gapmers degradan al ARNm de MSI2, mediante la actividad endonucleasa de la enzima RNasa-H, permitiendo la unión del gapmer con la secuencia por complementariedad y por ende reduciendo la sobreexpresión de MSI2. Por otro lado, los antagomiRs bloquean los microARNs que regulan negativamente la expresión de MBNL, como miR-23b y miR-218, lo que resulta en el aumento de esta proteína y consecuentemente mejora el proceso de splicing de los transcritos (Cerro et al., 2018; 2021; Overby et al., 2022).

MSI2 tiene diferentes variantes resultantes del mismo gen, que se generan en función del splicing alternativo; uno de los procesos que permite la generación de múltiples formas de ARNm, que se traducen en diferentes versiones de una proteína (Wuebben et al., 2012; Li et al., 2020). En los mamíferos hay 4 isoformas de MSI2, de las cuales, 2 poseen el motivo de reconocimiento a ARN (RNA Recognition Motif) conservado, permitiendo su unión al ARNm objetivo. La diferencia entre las isoformas radica en sus extremos N-terminal y C-terminal, lo que influye en sus funciones y la manera en que regulan a los genes. La isoforma MSI2a se expresa con mayor frecuencia en seres humanos, en los tejidos del cerebro, pulmón, intestino, páncreas y colon, facilitando la progresión de enfermedades como el cáncer, debido a su impacto sobre la migración celular y la estabilidad del ARNm (Bennett et al., 2016; MacNicol et al., 2017). Por otro lado, MSI2b se detecta en modelos murinos de células madre hematopoyéticas (HSCs) y en los tejidos

cerebrales e intestino, afectando la diferenciación celular, regulación de autorrenovación y promoviendo la transformación celular. Aunque las isoformas se conserven entre especies, tienen diferencias en su función y secuencia (Sabater et al., 2021; 2023). De igual forma, MSI2b se expresa en forma diversa según el tipo de línea celular, el microambiente y mecanismos de acción que tenga. Por último, MSI2c y MSI2d son las isoformas menos estudiadas y hay información que asociada con sus funciones específicas (Bennett et al., 2016; Li et al., 2020).

Los múltiples desafíos que presenta DM1 son un obstáculo significativo para conseguir avances en su tratamiento, tales como: el impacto de la expresión genética, la patogenicidad multisistémica, el diagnóstico con biomarcadores y el impacto psicosocial. Por ende, DM1 presenta efectos adversos directos e indirectos en la salud de los pacientes que padecen esta enfermedad. La patogenicidad multisistémica hace referencia la afección de diversos sistemas, principalmente nervioso central, cardiovascular, respiratorio y gastrointestinal. Este impacto lleva a un deterioro irreversible o incluso fatal, principalmente debido a la detección tardía y la falta de biomarcadores eficaces para identificar la presencia de DM1 (Braun et al., 2022; De Pontual & Tomé, 2022). En tal sentido, la spliceopatía en DM1 presentan una alta complejidad que dificulta un diagnóstico efectivo y preciso, debido a la variabilidad clínica observada entre pacientes. Para abordar este desafío, en este estudio se emplea el uso de bases de datos de humanos, ratones y células a través de la experimentación *in silico* para evaluar la concordancia de las mutaciones que influyen en la patogenicidad de DM1, además de probar un tratamiento experimental usando oligonucleótidos antisentido como los gapmers (Handal et al 2024). En este contexto, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué porcentaje de similitud estructural existe entre las proteínas de MSI2 en modelos de la enfermedad de DM1, y existe evidencia estructural de la unión de un tratamiento experimental (gapmer) con el mRNA de MSI2, mediante modelado *in silico*?

Actualmente, no se tiene un tratamiento efectivo aún y los ensayos clínicos realizados hasta la fecha no logran resultados satisfactorios, esto se debe a la variabilidad clínica en cada paciente (Abe et al., 2024). Por esta razón, este estudio mediante una aproximación de modelado molecular *in silico* determinará la variabilidad del uso de gapmer en la secuencia de ARNm de MSI2, siendo este un target específico para la secuencia del gapmer.

Este estudio tiene como objetivo evidenciar el mecanismo de funcionamiento del gapmer contra MSI2 en DM1 por medio de herramientas bioinformáticas en biopsias de cuádriceps de humanos, ratones y líneas celulares, permitiendo determinar el funcionamiento estructural del gapmer contra MSI2.

2. Materiales y Métodos

Se llevó a cabo un estudio cuantitativo utilizando herramientas bioinformáticas y análisis de datos para explorar la relación de las diferentes isoformas del MSI2. Al ser experimental *in silico* con un alcance descriptivo y correlacional, no implica trabajo en un laboratorio.

Organización de la información y herramientas bioinformáticas

Se utilizaron bases de datos que incluyeron muestras de biopsias de cuádriceps de pacientes con DM1, biopsias de cuádriceps de ratones modelado de la enfermedad y líneas celulares. Las muestras se organizaron de acuerdo con la información proporcionada en el GSE86356 de la base de datos GEO para biopsias humanas, el PMID28188264 del NCBI para líneas celulares y los datos para biopsias de ratones aún no son publicados (Arandel et al., 2017; Wang et al., 2019; MGI, 2025).

Además, se trabajó con programas y herramientas bioinformáticas como RStudio (versión R-4.4.2), Excel, Ensembl, Genecards, GTEX.portal, NCBI - GEO, AlphaFold (versión 2.2.0), PYMOL (versión 2.4.0), RhoFold (versión 0.3.0) y RhoDesing (versión fork 70b34f2) (NCBI, 2004; GTEX, 2013; Schrödinger & DeLano, 2020; RStudio, 2020; Jumper et al., 2021; Shen et al., 2022; RhoFold, 2023; RhoDesign, 2024; Ensembl, 2024; GeneCards, 2024).

Análisis y Control de calidad de las muestras

Utilizando R-Studio (versión R-4.4.2) se realizó una exploración en las bases de datos seleccionadas, para poder aplicar un control como Trimmomatic, limpiando y eliminando la información irrelevante, garantizando la pureza y precisión de los datos (Bolger et al., 2014; RStudio, 2024).

Alineamiento y cuantificación de isoformas

Al eliminar las secuencias de baja calidad, se alineó las secuencias de ARN con el programa STAR (versión 2.7.11b) (Dobin et al., 2013). A continuación, se cuantificó las isoformas de MSI2 con el programa RSEM para cuantificar las variaciones entre las muestras (versión 1.3.1), lo que permitió normalizar y transformar los datos para asegurar que estuvieran en un formato adecuado para su análisis (Li et al., 2011).

Identificación de isoformas alteradas de MSI2

Para el procesamiento de las isoformas de MSI2, se utilizó la herramienta DeSeq2 para realizar el análisis de expresión diferencial (Love et al., 2014). Esto permitió la identificación de diferencias significativas entre la expresión de las isoformas.

Análisis comparativo de las isoformas

Se recolectó los datos de expresión génica por tejido en las plataformas GTEx y MGI (GTEx, 2013; MGI, 2025). De esta manera, al obtener las estructuras tridimensionales de las secuencias de las isoformas con mayor expresión génica y con diferencias significativas mediante AlphaFold (versión 2.2.0) para obtener una estructura tridimensional de la proteína (AlphaFold, 2020; Jumper et al., 2021). Luego, se las comparó con el software de visualización molecular PyMOL (versión 2.4.0) (Schrödinger & DeLano, 2020). Se calculó el porcentaje de similitud estructural entre dos proteínas utilizando el comando align de PYMOL, lo que permitió alinear y obtener el valor de la desviación cuadrática media (RMSD). Después, se empleó el comando cmd.count_atoms para determinar el número de átomos de cada proteína. Finalmente, se aplicó la fórmula $\text{percentage_similarity} = (1 - (\text{rmsd_value} / \text{rmsd_max})) * 100$ para obtener el porcentaje de similitud estructural entre las dos proteínas. Por último, al utilizar RhoFold (versión 0.3.0) se obtuvo la estructura secundaria de ARN con un punto de corte mayor a 0,7 asegurando que las predicciones tengan solo regiones de ARN con alta confianza de plegamiento. Para finalizar, se usó RhoDesign (versión fork 70b34f2) para modelado estructural del gapmer, lo que permitió optimizar su uso para interactuar con las isoformas de MSI2 y que se complemente de mejor forma a las regiones diana (Shen et al., 2022; RhoFold, 2023; RhoDesign, 2024).

3. Resultados

Análisis PCA de perfiles de expresión de isoformas en DM1 vs Control

El análisis de PCA obtenido mediante R-Studio permitió visualizar la variabilidad en la expresión génica entre las muestras DM1 vs. Control de cada modelo, indicando una mayor similitud entre los grupos más cercanos, y diferencias significativas entre los más distantes. Adicional, el PCA calculó la variabilidad entre las muestras agrupadas. En la **Figura 1**, en las muestras humanas se observó una separación moderada, presentando que ambos grupos se distribuyen de manera diferente y que algunas áreas de las muestras se superponen. En las muestras de ratones, se apreció una mayor dispersión y variabilidad de las muestras. Finalmente, en las muestras de líneas celulares, la distancia fue más extensa, con un PC1 del 68% que sugiere diferencias en las características biológicas de DM1 vs. Control.

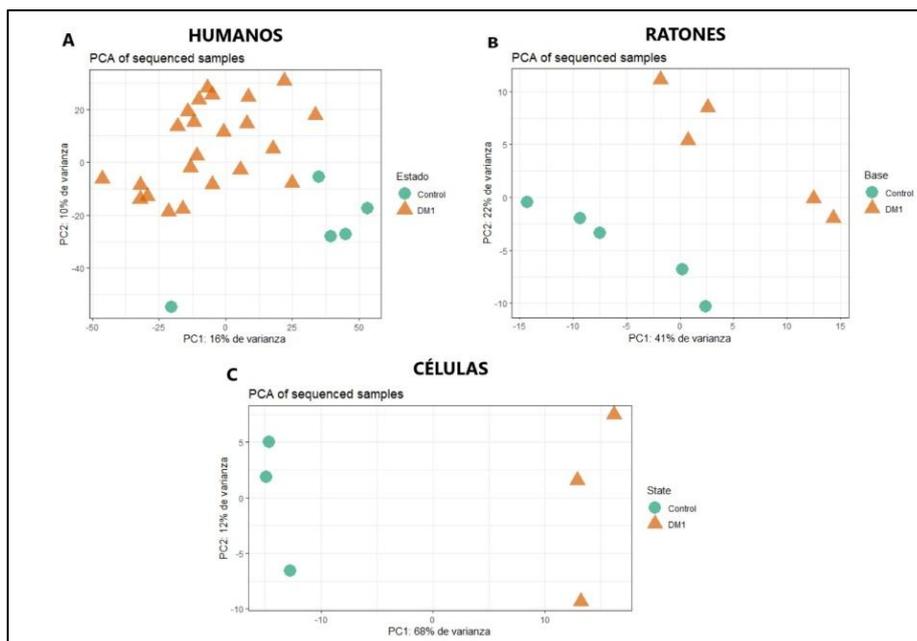


Figura 1. PCA de perfiles de expresión génica de isoformas en muestras de humanos, ratones y células con DM1 vs Control. Se observa la distribución de las muestras para reflejar la variabilidad en los perfiles de expresión y visualizar la agrupación o dispersión de los datos, donde el triángulo representa a DM1 y el círculo a Control. **(A)** humanos PC1 16% y PC2 10%. **(B)** ratones PC1 41% y PC2 22%. **(C)** células PC1 68% y PC2 12%.

Evaluación Comparativa de Isoformas

Análisis de la expresión de isoformas de Humanos y Líneas celulares

Se comparó las isoformas significativas de humanos y líneas celulares, así como sus características compartidas, como se indica en el diagrama de Venn de la **Figura 2**, en donde 284 isoformas están sobreexpresadas, 16 subexpresadas, 92 no alteradas y 9 no son significativas entre humanos y líneas celulares.

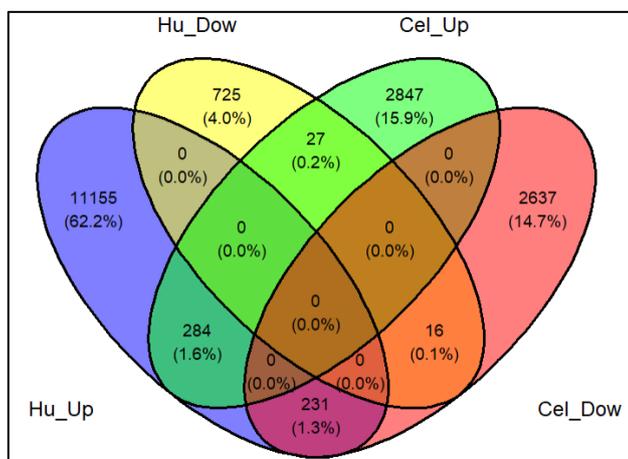


Figura 2. Diagrama comparativo de Venn entre Humanos vs Líneas celulares. Se muestran las isoformas que se expresan en ambos modelos: humanos en azul (Hu_Up / sobreexpresada) y amarillo (Hu_Down / subexpresada) y líneas celulares en verde (Cel_Up / sobreexpresada) y rojo (Cel_Down / subexpresada), donde los números indican la cantidad de isoformas excluidas y compartidas en cada condición, los porcentajes representan la proporción respecto al total de isoformas y las interacciones

presentan las isoformas comunes entre ambas bases de datos, permitiendo identificar las similitudes y diferencias entre los perfiles.

Detección diferencial de isoformas alteradas de MSI2 en DM1

Se determinaron las diferencias significativas en la expresión de cada isoforma específica entre las muestras analizadas mediante las herramientas DeSeq2 y RSEM. La **Figura 3**, muestra que las isoformas (ENST00000322684) en humanos y (ENST00000284073 y ENST00000416426) líneas celulares están alteradas significativamente. Los valores estadísticos de Long2 Fold Change son 2.85, 1.70 y 5.10, con un p-values de 0.00066, 1.79×10^{-11} y 1.51×10^{-5} , y el Padj es menor a 0.001, lo que indica que se encuentran significativamente (*Up Regulated*). En la **Tabla A1** ubicada en los anexos, se detallan por separado los valores estadísticos de cada isoforma identificada, centrándose en el tipo de expresión y los valores Padj, el P-value, los cuales indican si hay alteraciones significativas o no.

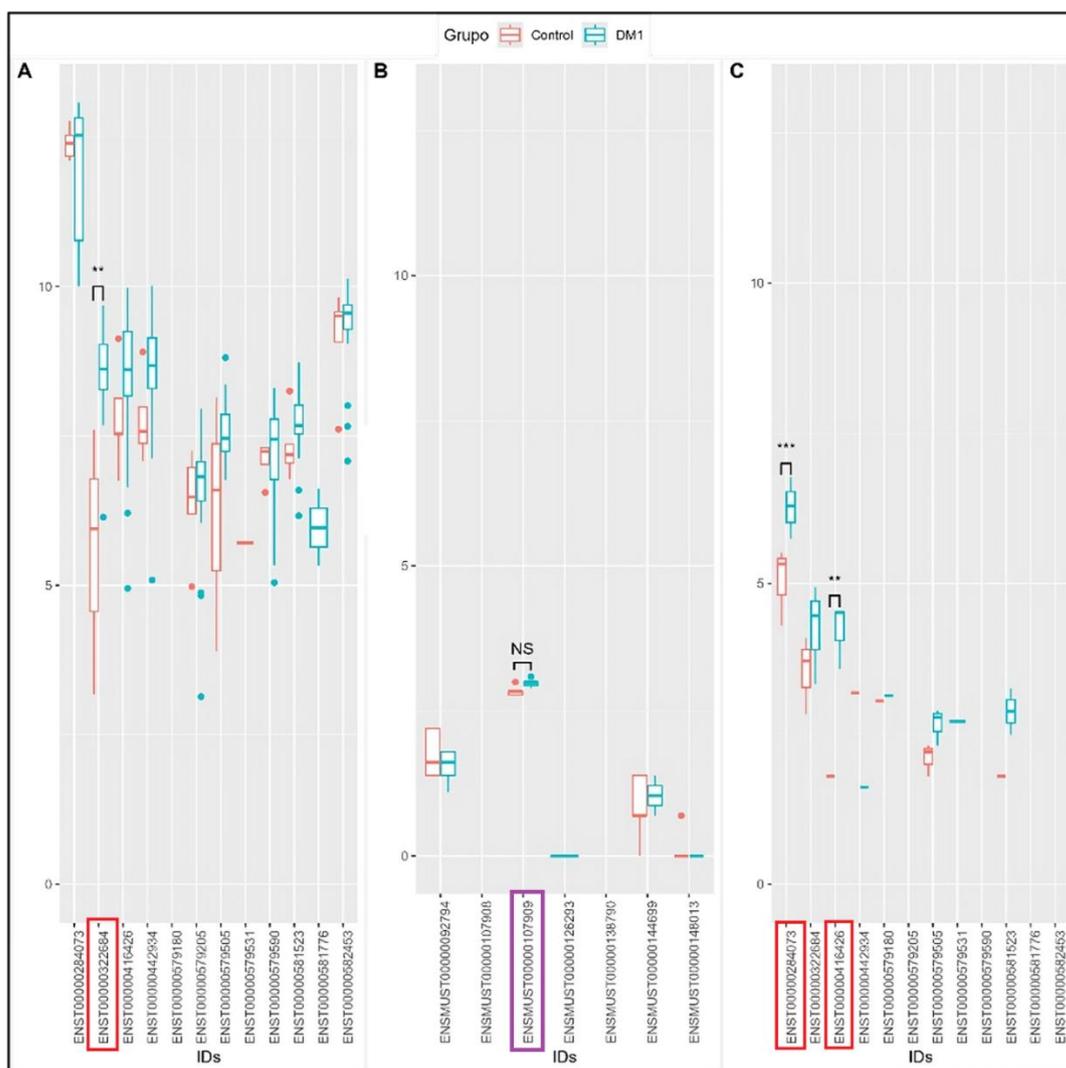


Figura 3. Boxplot que muestra la comparación de la expresión de las isoformas en modelos humanos, ratones y líneas celulares entre DM1 vs. Control. Se compara la expresión de isoformas

de MSI2 entre DM1 vs. Control en tres modelos biológicos. Se resaltan con un recuadro rojo las isoformas significativamente alteradas en el Panel A (humanos) y Panel C (células), mientras que en morado se indica la única isoforma que no presenta alteraciones en el Panel B (ratones), donde predomina en tejido musculoesquelético en ratones.

Similitud Estructural de Isoformas

Porcentaje Global

Los modelos predichos por AlphaFold sirvieron como una aproximación inicial para el análisis estructural de las isoformas alteradas significativamente. Se evaluó la calidad de los modelos mediante el cálculo del promedio global (pLDDT), que cuantifica el grado de confianza general de las predicciones estructurales obtenidas. Según la Figura 4, los valores del porcentaje global oscilaron entre 83.98 a 84.84%, valores que indican que el nivel de confianza es alto y que por ende estos modelos son adecuados para la aplicación de gapmers. Por otro lado, el valor de la desviación estándar oscila entre 8.27 a 10.3, indicando que en ciertas regiones hay una variabilidad interna que es menos estable y confiable.

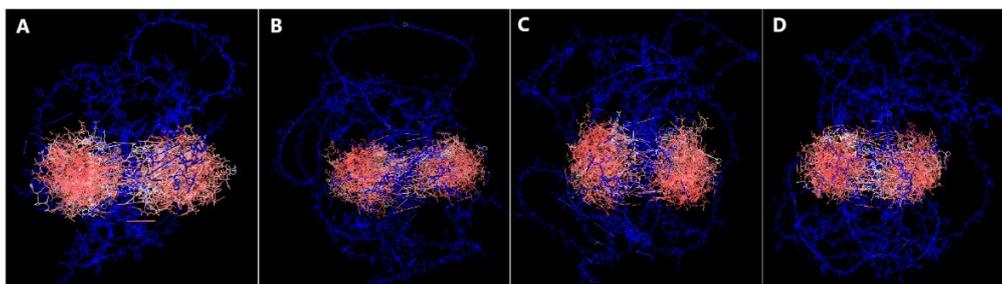


Figura 2. Cálculo del porcentaje global AlphaFold. (A) Isoforma Humana ENST00000322684 con un 83.98% y un SD 8.27. (B) Isoforma Ratón ENSMUST00000107909 con un 84.40% y un SD 10.03; (C) Isoforma Célula_1 ENST00000284073 con un 84.66% y un SD 10.02; (D) Isoforma Célula_2 ENST00000416426 con un porcentaje del 84.84% y un SD 9. La colorimetría de las isoformas nos permite visualizar las regiones con mayor y menor confianza, donde azul es alta confianza, blanco confianza moderada y rojo baja confianza.

Comparación estructural entre isoformas de MSI2

Mediante la comparación entre las isoformas alteradas y la isoforma ENST00000674522, dominante en este tejido, se evaluó las implicaciones biológicas dentro de los diferentes modelos utilizados, se validó la existencia de similitud entre los modelos predictivos y se determinó si las diferencias estructurales podrían ser útiles para el diseño de terapias. Como se observa en la **Figura 5**, se calculó un porcentaje de similitud que oscila entre 70.45 a 72.48% y un RMSD situado entre 27.519 a 29.553 Å, confirmando que hay una diferencia estructural por las alteraciones genéticas, las mutaciones, el tipo de splicing y las variaciones en las secuencias.

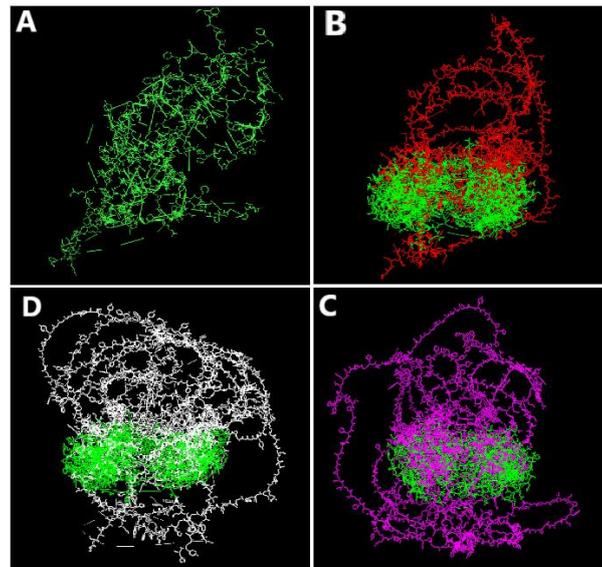


Figura 3. Comparación de las estructuras tridimensionales de las isoformas alteradas con la isoforma dominante de MSI2 en el tejido músculo esquelético, visualizadas en PYMOL. (A) La isoforma ENST00000674522 de color verde, es la más expresada de MSI2 que domina el tejido en humanos y líneas celulares. (B) Comparación de similitud estructural entre la isoforma alterada Humano con la isoforma dominante 72.48% y RMSD: 27.519 Å. (D) Comparación de similitud estructural entre la isoforma alterada Célula_1 con la isoforma dominante 70.65% y RMSD: 29.348 Å. (C) Comparación de similitud estructural entre la isoforma alterada Célula_2 con la isoforma dominante 70.45% y RMSD: 29.553 Å.

Porcentaje de similitud

El análisis del porcentaje de similitud entre las isoformas alteradas de MSI2 obtenidas, permitió determinar qué tan conservadas se encuentran las estructuras tridimensionales. En la **Figura A1** ubicada en los anexos, se observa que los valores de similitud oscilan entre 68.64 a 71.78%. Además, el valor de RMSD oscila entre 28.211 y 31.363 Å, sugiriendo que las isoformas aún conservan gran parte de su estructura. En la **Figura 6**, se muestran las similitudes y diferencias estructurales de las isoformas de humanos y líneas celulares con respecto a la isoforma de ratón (ENSMUST00000107909).

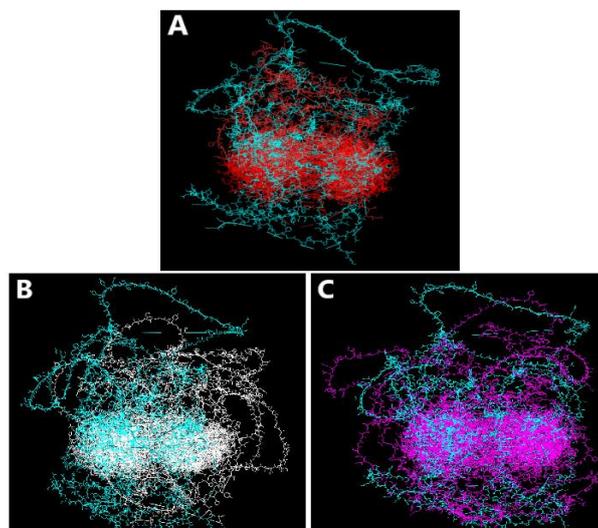


Figura 4. Visualización de la similitud entre estructuras tridimensionales de las isoformas alteradas de MSI2, analizado en PYMOL. La gráfica muestra la comparación entre la isoforma de ratón ENSMUST00000107909 de color celeste y las otras isoformas alteradas, junto con sus respectivos valores de similitud y el RMSD. **(A)** Con la isoforma alterada Humano tiene un 69.43% de similitud y un RMSD del 30.567 Å. **(B)** Con la isoforma alterada Célula_1 tiene un 71.78% de similitud y un RMSD del 28.211 Å. **(C)** Con la isoforma alterada Célula_2 tiene un 68.64% de similitud y un RMSD del 31.363 Å.

Aplicación de los tratamientos Gapmer y Scramble (SC)

Al aplicar el gapmer a la región complementaria de la secuencia de MSI2 de humano, se obtuvo una similitud del 92.3%. En la **Figura 7**, se presenta la alta afinidad estructural entre las dos secuencias, facilitando la capacidad del gapmer para unirse de forma complementaria al ARNm de MSI2.



Figura 5. Visualización de la complementariedad *in silico* del gapmer con la secuencia del mRNA de MSI2 de humano. Alineación del gapmer de color amarillo sobre la estructura de la secuencia de MSI2 de color magenta y de color celeste la estructura del gapmer sobrepuesta aún no alineada.

El SC es utilizado como un control negativo y no puede alinearse a la secuencia de MSI2 de humano, porque no posee una región complementaria, lo que resulta en un 0% de similitud entre las dos secuencias. Sin embargo, al pasar el SC por el BLAST de NCBI, se obtuvo una similitud del 100% con el gen CYP2S1 del citocromo P450 ubicado en el intrón 4 del cromosoma 19. En la

Figura 8, se muestra la predicción del alineamiento del SC con la secuencia de MSI2 y mientras en la Figura 9, se presenta el alineamiento del SC con la secuencia del gen CYP2S1 del citocromo P450.



Figura 6. Visualización de la predicción del alineamiento del SC con la secuencia de MSI2 de humanos. Se hizo el alineamiento mediante la herramienta PYMOL, obteniendo un porcentaje de similitud del 0%. En el gráfico se muestra la estructura de la secuencia de MSI2 representada de color magenta, mientras que la secuencia de control negativo SC se muestra de color blanca. Las regiones alineadas entre ambas secuencias están resaltadas de color amarillo.

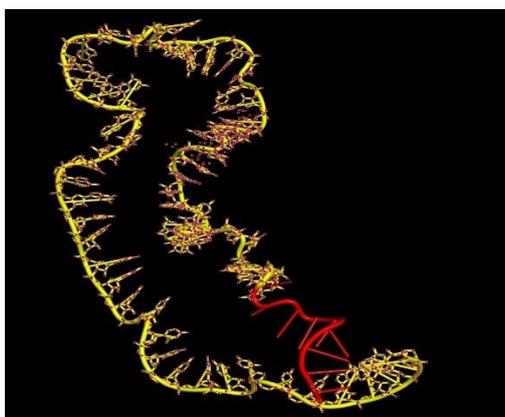


Figura 7. Visualización de la predicción del alineamiento del SC con la secuencia del gen CYP2S1 del citocromo P450. El alineamiento se realizó utilizando la herramienta PYMOL, obteniendo un porcentaje de similitud del 96.04%, mientras que el BLAST mostró una relación del 100%. Las regiones alineadas se colorearon de amarillo y la secuencia del gen CYP2S1 en rojo.

Al aplicar el gapmer de igual forma en la región complementaria de la secuencia de MSI2 de ratón, se obtuvo una similitud del 92.9%. En la **Figura 10**, se representa la capacidad del gapmer para unirse de forma complementaria a la secuencia y en la **Figura 11**, el SC al alinearse a la secuencia de MSI2 de ratón, tuvo una similitud del 0%.



Figura 10. Aplicación de gapmer en la secuencia de MSI2 de ratón. Alineación del gapmer de color amarillo sobre la estructura de la secuencia de MSI2 de color verde y de color celeste la estructura del gapmer sobrepuesta aún no alineada.

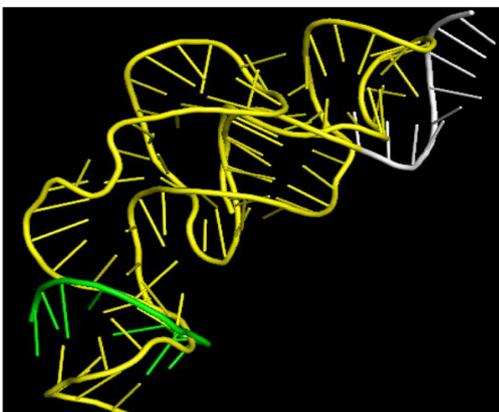


Figura 11. Predicción alineamiento del SC con la secuencia de MSI2 de ratón. El alineamiento mostró un porcentaje de similitud del 0%. En el gráfico se muestra la estructura de la secuencia de MSI2 representada de color verde, mientras que la secuencia de control negativo SC se muestra de color blanca. Las regiones alineadas entre ambas secuencias están resaltadas de color amarillo.

4. Discusión

En los últimos años, se han publicado varios estudios sobre las alteraciones en las vías de señalización que están asociados a la regulación de MSI2, contribuyendo a la sintomatología musculoesquelética de DM1 y diferentes tipos de cánceres (Smith & Gutman, 2016; Sabater et al., 2023; Moreno et al., 2024).

Debido a la complejidad de DM1, no se han logrado desarrollar hasta el momento estrategias eficaces de diagnóstico y/o de tratamiento. Aunque se han propuesto diferentes estrategias, su aplicación a gran escala aún está en proceso de evaluación. En este sentido, los resultados de este estudio son relevantes, al demostrar el funcionamiento del Gapmer tanto por su complementariedad de secuencia y estructura tridimensional a nivel de ARNm de MSI2. Además, el estudio de Stoodley (2023) respalda la afirmación en el uso de ASOs como una estrategia terapéutica para DM1, ya que los gapmers han demostrado la capacidad de unirse de manera

específica al ARNm patológico, regulando la expresión génica alterada en la enfermedad (Stoodley et al., 2023).

Mediante la expresión diferencial de las isoformas de MSI2 en biopsias de cuádriceps de humanos, ratones y líneas celulares con DM1, se identificó alteraciones significativas en humanos y líneas celulares provenientes de tejido musculoesquelético, cuyas variantes están relacionadas por la sobreexpresión y subexpresión de sus isoformas. Sin embargo, en el modelo murino no se detectaron diferencias significativas, aunque el gapmer si se pega al transcrito ENSMUST00000107909. Esta falta de cambio a nivel de isoformas se puede deber a la fisiología del modelo animal, falta de datos para comparar y otros factores asociados a la naturaleza de la muestra (Li et al., 2020; Zhu et al., 2022).

Al realizar el cálculo de similitud estructural entre las isoformas alteradas y las que presentaba mayor expresión en tejido musculo esquelético, mediante el uso de herramientas bioinformáticas como PYMOL y AlphaFold, se determinó que las estructuras tridimensionales tuvieron una similitud entre el 69 al 71%, indicando que se encuentran conservadas e identificando las diferencias estructurales de cada una. Además, al realizar el alineamiento de la secuencia de ratón con el gapmer, se obtuvo una similitud del 92,9%. Estos hallazgos son relevantes, debido a que en estudios previos como el de Jumper (2021), han demostrado que AlphaFold predice estructuras proteicas con una alta precisión, facilitando el análisis en la relación entre la conservación estructural y su función. En tal sentido, podría el splicing influir en la estabilidad y eficacia del gapmer, destacando la importancia del análisis estructural para la comprensión del mecanismo de acción (Jumper et al., 2021).

El plegamiento complementario del gapmer en la posición 1-20 da distintos porcentajes de similitud al unirse al ARNm de MSI2 de humano y ratón. Aunque en ambos casos se presente una secuencia casi idéntica, la diferencia se localiza en el quinto bloque de nucleótidos entre la posición 34-42 de 5' → 3'; para humano es CUACGAA, mientras que en ratón es CAACGAA. El estudio de Hagedorn (2017) destaca la importancia de la especificidad de los ASOs y cómo una variación en la secuencia puede afectar la eficiencia del gapmer para modificar la expresión génica y en el tratamiento experimental (Hagedorn et al., 2017).

La aplicación del gapmer dirigido hacia el ARNm de MSI2, tiene como finalidad interferir con la transcripción del ARNm y regular la expresión de MSI2 de una manera precisa. Sin embargo, es necesario considerar la aparición de otras dianas de unión (*off targets*) resultantes de

interacciones no predichas, con secuencias de ARN complementarias pero que no son de interés, o que podrían ocasionar efectos secundarios inesperados (Zhang et al., 2021; Lauffer et al., 2024).

La complementariedad identificada entre el SC y el gen CYP2S1 del citocromo P450, tuvo algunas regiones conservadas o repetitivas del genoma humano dentro del intrón 4 del cromosoma 19, obteniendo un 100% de coincidencia entre las secuencias. Sin embargo, esta coincidencia puede darse por una similitud estructural entre las secuencias, ya que la disminución del gen CYP2S1 altera varias rutas metabólicas, provocando efectos tóxicos que contribuyen al desarrollo del cáncer de mama, pulmón, hígado y colorrectal por la acumulación de compuestos y sustancias carcinógenas (Aiyapa et al., 2022).

5. Conclusiones

Los resultados de este estudio resaltan la relevancia de MSI2 en el desarrollo patogénico de DM1 y su relación con el deterioro musculoesquelético. A pesar del potencial terapéutico de los oligonucleótidos antisentido, aún no existen estrategias y tratamientos eficaces para esta enfermedad basados en esta tecnología, o están en etapas iniciales de investigación en ensayos clínicos. Este estudio demostró la eficiencia del gapmer para unirse al ARNm de MSI2 *in silico*, lo que contribuye a la regulación de su expresión génica.

La identificación y cuantificación de las isoformas de MSI2 en biopsias de cuádriceps humanas, líneas celulares y modelos murinos, a partir de repositorios públicos, revelaron las diferencias significativas en su expresión, especialmente en humanos y líneas celulares. Estos hallazgos evidencian la relación en el funcionamiento de las isoformas y su papel patológico en DM1. Sin embargo, no se encontraron alteraciones significativas en el modelo murino por factores fisiológicos del modelo y la naturaleza de las muestras utilizadas.

El análisis estructural permitió caracterizar las variaciones de MSI2, donde se identificó las regiones con mayor confiabilidad de calidad y conservación mediante el cálculo del pLDDT y la comparación de isoformas obtenidas de AlphaFold.

La herramienta PYMOL por otro lado, permitió visualizar el acoplamiento del gapmer mediante una simulación *in silico*, evidenciando las variaciones en las secuencias entre especies que podrían afectar la eficiencia del gapmer y afectación de posibles (*off-targets*). Además, la relación del SC con el gen CYP2S1, podría ocasionar el desequilibrio en diferentes rutas metabólicas y contribuir al desarrollo del cáncer de mama por la acumulación de carcinógenos.

Estos hallazgos en el estudio destacan la complejidad de DM1 y la necesidad de seguir investigando esta enfermedad compleja. Además, en futuros tratamientos experimentales implementar el uso de oligonucleótidos antisentido para DM1 y evitar el desarrollo de esta enfermedad.

Como conclusión, el gapmer tuvo una mejor unión con la secuencia de MSI2 de ratones que con la de humanos, aunque la diferencia es pequeña, vale la pena desarrollar un gapmer que tenga mayor afinidad al unirse por complementariedad al mRNA de MSI2 de humano, ya que su aplicación influye sobre la expresión de MSI2 y por ende reducir las afecciones patológicas de DM1, pero para poder afirmar esto es necesario realizar más estudios a futuro tanto *in silico*, *in vitro* y también *in vivo*.

Recomendaciones

Es fundamental continuar investigando y experimentando por medio de métodos *in silico* y herramientas bioinformáticas que identifiquen e interpreten las variantes de MSI2 mediante simulaciones biológicas, moleculares y sus interacciones.

Estos estudios permiten reconocer el comportamiento de las isoformas de MSI2 e impulsan nuevas líneas de investigación enfocadas a mitigar los riesgos relacionados con las mutaciones presentes en DM1. Este enfoque incentiva el progreso la innovación en la industria médica como farmacéutica, ya que el nuevo conocimiento estimulará a la comunidad científica a seguir desarrollando nuevas terapias biomédicas, promover la investigación y mejorar los métodos de diagnóstico. Lo que contribuye a profundizar la comprensión de esta enfermedad genética.

Contribución de los Autores: Conceptualización, J.L.M.S y J.P.E.E; Metodología, J.L.M.S y J.P.E.E; Supervisión, J.P.E.E; Escritura, revisión y edición, J.L.M.S y J.P.E.E; Recursos, J.L.M.S y J.P.E.E. “Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito.”

Financiamiento/Fondos: Esta investigación no recibió financiación externa.

Agradecimientos: Personas, Instituciones. En esta sección, puede reconocer cualquier apoyo brindado que no esté cubierto por las secciones de contribución o financiamiento del autor. Esto puede incluir apoyo administrativo y técnico, logístico, o donaciones en especie (por ejemplo, materiales utilizados para experimentos).

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

6. Referencias citadas

1. Abe, K., Hirose, Y., Kumagai, T., Hashiya, K., Hidaka, K., Emura, T., Bando, T., Takeda, K., & Sugiyama, H. (2024). Estudios estructurales de un complejo de una repetición CAG/CTG Molécula de unión específica de secuencia y que contiene desajustes A-A ADN. *JACS Au*. <https://doi.org/10.1021/jacsau.3c00830>
2. Aiyappa, R., Storr, S., Rakha, E., Green, A., Ellis, I., & Martin, S. (2022). La expresión de CYP2S1 y CYP2W1 se asocia con la supervivencia de las pacientes en cáncer de mama. *Revista de patología. Investigación clínica*, 8(6), 550–566. <https://doi.org/10.1002/cjp2.291>
3. AlphaFold. (2022) AlphaFold Protein Structure Database. Recuperado de <https://alphafold.com/>
4. Arandel, L., Espinoza, M. P., Matloka, M., Bazinet, A., De Dea Diniz, D., Naouar, N., Rau, F., Jollet, A., Edom, F., Mamchaoui, K., Tarnopolsky, M., Puymirat, J., Battail, C., Boland, A., Deleuze, J. F., Mouly, V., Klein, A. F., & Furling, D. (2017). Inmortalización de líneas celulares musculares de distrofia miotónica humana para evaluar compuestos terapéuticos. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 10(4), 487–497. <https://doi.org/10.1242/dmm.027367>
5. Bennett, C. G., Riemondy, K., Chapnick, D. A., Bunker, E., Liu, X., Kuersten, S., & Yi, R. (2016). Genome-wide analysis of Musashi-2 targets reveals novel functions in governing epithelial cell migration. *Nucleic acids research*, 44(8), 3788–3800. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw207>
6. Bolger, A., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: un recortador flexible para los datos de secuencia de Illumina. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
7. Braun, M., Shoshani, S., & Tabach, Y. (2022). Los cambios en el transcriptoma en los tejidos de los pacientes con DM1 están gobernados por la vía de interferencia del ARN. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.955753>
8. Cerro, E., Sabater, M., Fernández, J. M., et al. (2018). El silenciamiento de miR-23b y miR-218 aumenta la expresión de Muscleblind-like y alivia los fenotipos de distrofia miotónica en modelos de mamíferos. *Nature Communications*, 9(1), 2482. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04892-4>
9. Cerro, E., Gonzáles, I., Moreno, N., Espinosa, J., Fernández, J., Colom, A., Overby, S., Seoane, D., Poyatos, J., Vilchez, J., López de Munain, A., Varela, M., Wood, M., Pérez, M., Llamusi, B., & Artero, R. (2021). Caracterización preclínica del antagomiR-218 como potencial

- tratamiento de la distrofia miotónica. *Terapia Molecular - Ácidos Nucleicos*, 26, 174-191. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.04.001>
10. Choudhury, N. R., de Lima Alves, F., de Andrés-Aguayo, L., Graf, T., Cáceres, J. F., Rappsilber, J., & Michlewski, G. (2013). Control tisular específico de la biogénesis de miR-7 enriquecida en el cerebro. *Genes y desarrollo*, 27(1), 24–38. <https://doi.org/10.1101/gad.199190.112>
 11. Dobin, A., Davis, C., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. (2013). STAR: alineador universal ultrarrápido de RNA-seq. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
 12. De Pontual, L., & Tomé, S. (2022). Overview of the Complex Relationship between Epigenetics Markers, CTG Repeat Instability and Symptoms in Myotonic Dystrophy Type 1. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3477. <https://doi.org/10.3390/ijms23073477>
 13. Ensembl. (2024). Ensembl: Una base de datos de genómica. Recuperado de <https://www.ensembl.org/index.html>
 14. GeneCards. (2024). GeneCards: La base de datos de genes humanos. Recuperado de <https://www.genecards.org/>
 15. Genética y Medicina Avanzada (2016), Comparación de los genes de ratón y humano: Nuevas clases, <https://geneticaymedicinaavanzada.blogspot.com/2016/06/la-comparacion-de-los-genomas-de-un.html>
 16. GTEx Consortium. (2013). GTEx Portal. Recuperado de <https://gtexportal.org/home/>
 17. Handal, T., Juster, S., Abu, M., Yanovsky, S., Zahdeh, F., Aviel, U., Sarel, R., Michael, S., Bnaya, E., Sebban, S., Buganim, Y., Drier, Y., Mouly, V., Kubicek, S., Walther, B., Wansink, D., Epsztejn, S., & Eiges, R. (2024). La diferenciación pasa de un estado de heterocromatina reversible a uno irreversible en el locus DM1. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47217-4>
 18. Hagedorn, P. H., Hansen, B. R., Koch, T., & Lindow, M. (2017). Gestión de la especificidad de la secuencia de oligonucleótidos antisentido en el descubrimiento de fármacos. *Investigación en ácidos nucleicos*, 45(5), 2262–2282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx056>
 19. Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., & Thornton, C. A. (2004). La distrofia miotónica tipo 1 se asocia con focos nucleares de ARN mutante, secuestro de proteínas muscleblind y empalme alternativo desregulado en las neuronas. *Genética molecular humana*, 13(24), 3079–3088. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh327>

20. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
21. Konieczny, P., Stepniak-Konieczna, E., & Sobczak, K. (2014). Proteínas MBNL y sus ARN diana, interacción y regulación del empalme. *Investigación de ácidos nucleicos*, 42(17), 10873–10887. <https://doi.org/10.1093/nar/gku767>
22. Korać, P., Antica, M., & Matulić, M. (2021). MiR-7 en el desarrollo del cáncer. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030325>
23. Lauffer, M., Roon, W., & Aartsma, A. (2024). Possibilities and limitations of antisense oligonucleotide therapies for the treatment of monogenic disorders. *Communications Medicine*, 4(6). <https://doi.org/10.1038/s43856-023-00419-1>
24. Li, B., & Dewey, C. (2011). RSEM: cuantificación precisa de la transcripción a partir de datos de RNA-Seq con o sin un genoma de referencia. *BMC Bioinformatics*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
25. Li, M., Li, A. Q., Zhou, S. L., Lv, H., Wei, P., & Yang, W. T. (2020). RNA-binding protein MSI2 isoforms expression and regulation in progression of triple-negative breast cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 39(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01587-x>
26. Love, M., Huber, W., & Anders, S. (2014). Estimación moderada del cambio de pliegue y la dispersión para datos de RNA-seq con DESeq2. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
27. MacNicol, M., Cragle, C., McDaniel, F., Hardy, L., Wang, Y., Arumugam, K., Rahmatallah, Y., Glazko, G., Wilczynska, A., Childs, G., Zhou, D., & MacNicol, A. (2017). Evasión de la fosforilación reguladora mediante una isoforma empalmada alternativa de Musashi2. *Sci Rep* 7, 11503. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11917-3>
28. Matalkah, F., Jeong, B., Sheridan, M., Horstick, E., Ramamurthy, V., & Stoilov, P. (2022). Las proteínas Musashi dirigen el control postranscripcional de la expresión de proteínas y el empalme alternativo de exones en fotorreceptores de vertebrados. *Biología de las comunicaciones*, 5(1), 1011. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03990-w>

29. Milne, C., & Hodgkin, J. (1999). ETR-1, un homólogo de una proteína relacionada con la distrofia miotónica, es esencial para el desarrollo muscular en *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 9(21), 1243–1246. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80504-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80504-1)
30. MGI. (2025) Mouse Genome Informatics Portal. Recuperado de <https://www.informatics.jax.org/>
31. Moreno, N., Sabate, M., Sevilla, T., Alonso, M., Ohana, J., Bargiela, A., & Artero, R. (2024). Potencial terapéutico de la suplementación con ácido oleico en modelos de células musculares con distrofia miotónica. *Biological Research*, 57(1). <https://doi.org/10.1186/s40659-024-00496-z>
32. National Center for Biotechnology Information. (2004). Gene Expression Omnibus (GEO). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
33. Overby, S., Cerro, E., Llamusi, B., & Artero, R. (2022). RNA-mediated therapies in myotonic dystrophy. *Drug Discovery Today*, 27(8), 2172-2181. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.08.004>
34. RhoFold. (2023). RhoFold GitHub repository. GitHub. Recuperado de <https://github.com/ml4bio/RhoFold>
35. RhoDesign. (2024). RhoDesign GitHub repository. GitHub. Recuperado de <https://github.com/ml4bio/RhoDesign>
36. RStudio. (2020). RStudio Desktop. Recuperado de <https://posit.co/download/rstudio-desktop/>
37. Sabater, M., Bargiela, A., Moreno, N., Poyatos, J., Vilchez, J., & Artero, R. (2021). Musashi-2 contribuye a la disfunción muscular de la distrofia miotónica al promover la autofagia excesiva a través de la represión de la biogénesis de miR-7. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 25, 652–667. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.08.010>
38. Sabater, M., Moreno, N., Sevilla, T., Perez, M., Bargiela, A., & Artero, R. (2023). Msi2 mejora la disfunción muscular en un modelo de ratón con distrofia miotónica tipo 1. *Biomedical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2023.100667>
39. Schrödinger, L., & DeLano, W. (2020). PyMOL. Retrieved from <http://www.pymol.org/pymol>
40. Shen, T., Hu, Z., Peng, Z., Chen, J., Xiong, P., Hong, L., Zheng, L., Wang, Y., King, I., Wang, S., Sun, S., & Li, Y. (2022). E2Efold-3D: End-to-End Deep Learning Method for accurate de novo RNA 3D Structure Prediction. arXiv. <https://arxiv.org/abs/2207.01586>
41. Smith, C. A., & Gutmann, L. (2016). Distrofia miotónica tipo 1: tratamiento y terapéutica. *Opciones de tratamiento actuales en neurología*, 18(12), 52. <https://doi.org/10.1007/s11940-016-0434-1>

42. Stoodley, J., Vallejo, F., Seone, D., Debas, M., Wood, M., & Varela, M. (2023). Aplicación de conjugados antisentido para el tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2697. <https://doi.org/10.3390/ijms24032697>
43. Wang, E., Treacy, D., Eichinger, K., Struck, A., Estabrook, J., Olafson, H., Wang, T., Bhatt, K., Westbrook, T., Sedehizadeh, S., Ward, A., Day, J., Brook, D., Berglund, J. A., Cooper, T., Housman, D., Thornton, C., & Burge, C. (2019). Alteraciones del transcriptoma en la distrofia miotónica, el músculo esquelético y el corazón. *Human Molecular Genetics*, 28(8), 1312–1321. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy432>
44. Wuebben, E., Mallanna, S., Cox, J., & Rizzino, A. (2012). Musashi2 es necesario para la autorrenovación y la pluripotencia de las células madre embrionarias. *PloS one*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034827>
45. Yadava, R., Mandal, M., & Mahadevan, M. (2024). Estudio del efecto de la pérdida de MBNL1 y MBNL2 en la regeneración del músculo esquelético. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5). <https://doi.org/10.3390/ijms25052687>
46. Zhang, M., Bahal, R., Rasmussen, T., Manautou, J., & Zhong, X. (2021). El crecimiento de las terapias basadas en siRNA: estudios clínicos actualizados. *Farmacología bioquímica*, 189, 114432. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114432>
47. Zhong, B., Ma, Y., Sun, J., Tang, J., & Dong, M. (2024). El factor de transcripción FOXF2 promueve el desarrollo y la progresión del cáncer de páncreas al dirigirse a MSI2. *Oncology Reports*, 52(1). <https://doi.org/10.3892/or.2024.8752>
48. Zhu, Y., Zhou, B., Hu, X., Ying, S., Zhou, Q., Xu, W., Feng, L., Hou, T., Wang, X., Zhu, L., & Jin, H. (2022). LncRNA LINC00942 promueve la quimiorresistencia en el cáncer gástrico al suprimir la degradación de MSI2 para mejorar la estabilidad del ARNm de c-Myc. *Medicina clínica y traslacional*, 12(1), e703. <https://doi.org/10.1002/ctm2.703>

7. Anexos

Tabla A1. Identificación las isoformas significativamente alteradas.

	Base Mean	Log2 Fold Change	lfcSE	Stat	Pvalue	Padj	Result	Gene_Symbol	entrezgene_id
ENST00000322684	4013.397	2.848701	0.8365774	3.405186	0.0006611907	0.008249456	Up Regulated	MSI2	124540
ENST00000284073	333.13284	1.704018	0.253514	6.721592	1.797493e-11	2.849985e-09	Up Regulated	MSI2	124540
ENST00000416426	33.93511	5.109568	1.181038	4.326336	1.516103e-05	6.581144e-04	Up Regulated	MSI2	124540
ENSMJST00000107909	18,50521	-0.1933379	0.2713969	-0.7123807	0.4762291	0.969089	Not Altered	MSI2	76626

Tabla donde se muestra los valores de las isoformas significativamente alteradas para el gen MSI2 utilizando la herramienta R-Studio.

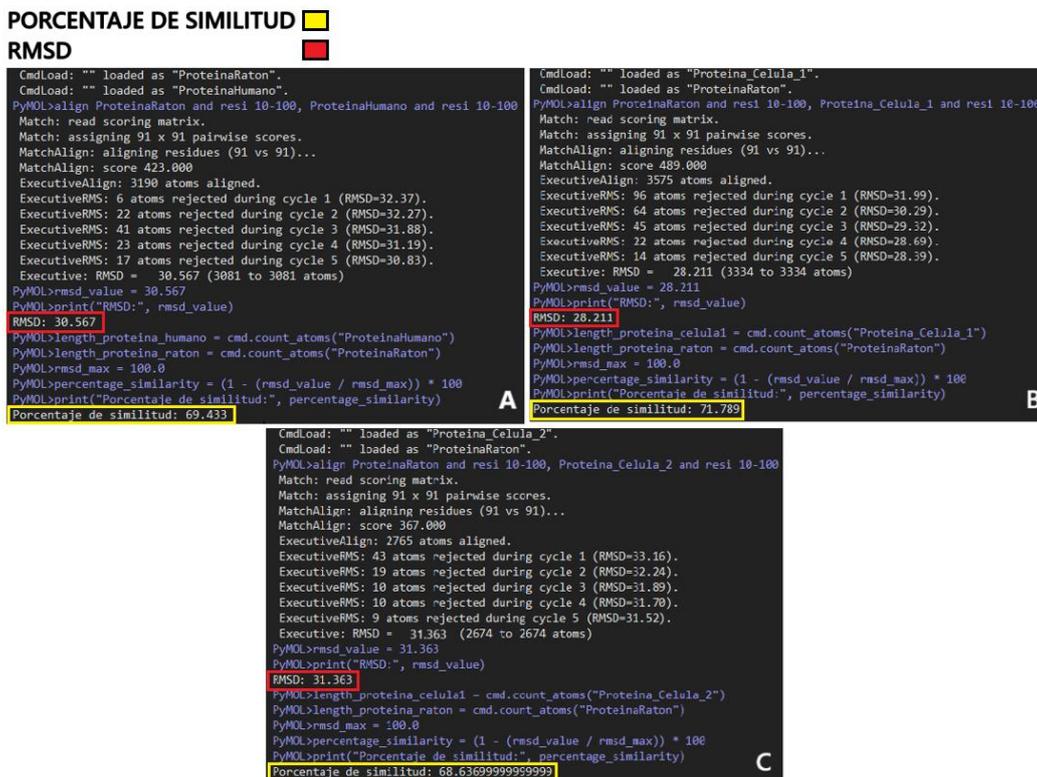


Figura A1. Cálculo del porcentaje de similitud entre humanos y líneas celulares vs ratón. Se realizó el cálculo mediante la herramienta bioinformática PYMOL, usando el mismo código adaptado en cada comparación. (A) Se realizó el cálculo del porcentaje de similitud entre Humano vs Ratón. (B) Se realizó el cálculo del porcentaje de similitud entre Célula_1 vs Ratón. (C) Se realizó el cálculo del porcentaje de similitud entre Célula_2 vs Ratón.

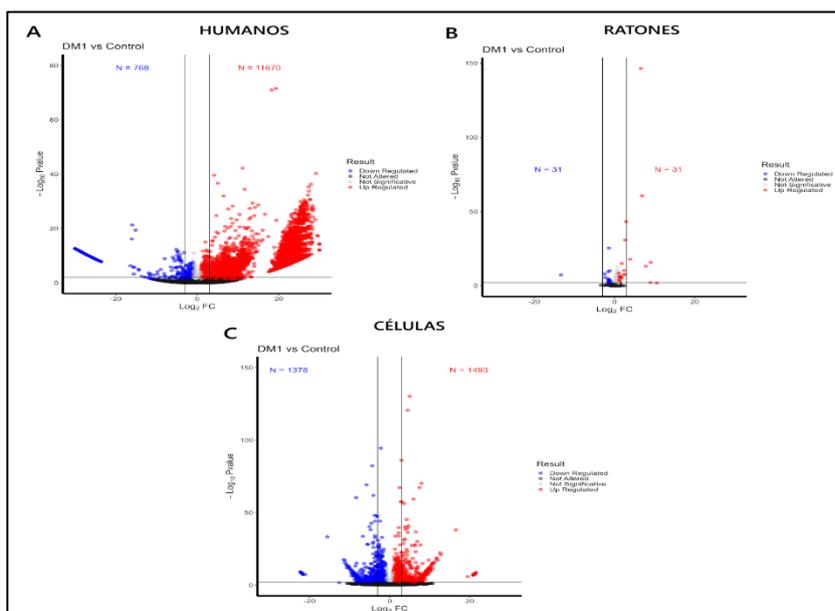


Figura A2. Comparación de perfil genético en DM1 vs Control en diferentes modelos biológicos. En el gráfico de vulcano plot se identifica la expresión diferencial de la enfermedad DM1 en tres modelos. (A) en este panel de humanos se observa una gran cantidad de genes con 11670 que se encuentran Up Regulated y 768 Down Regulated. (B) el panel de ratones hay una menor cantidad de genes significativamente alterados

con un 31 en ambas direcciones. (C) en el panel de células el número de genes es intermedio con 1493 Up Regulated y 1378 Down Regulated.

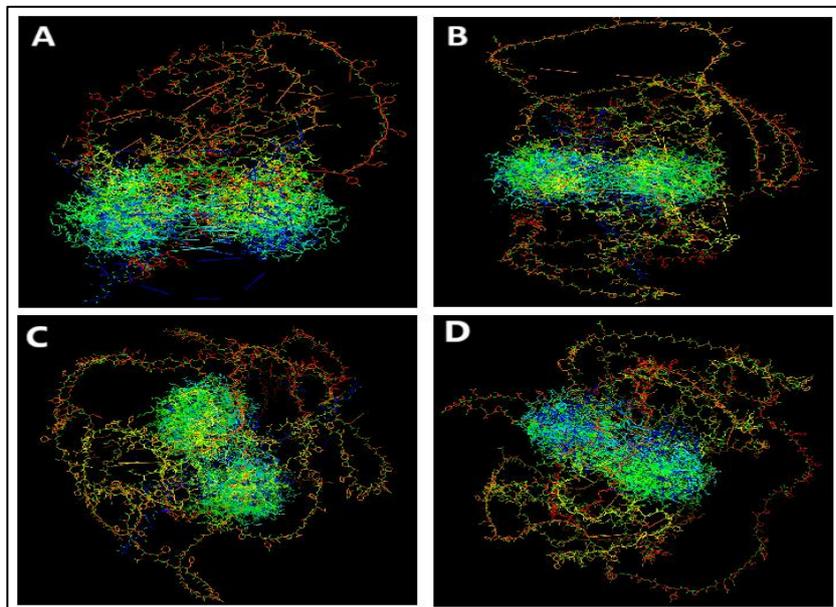


Figura A3. Predicción estructural tridimensional de isoformas de MSI2. El gráfico muestra la representación estructural de las isoformas alteradas significativamente de MSI2. (A) Humano, (B) Ratón, (C) Célula_1 y (D) Célula_2. Esta predicción nos permitirá determinar su pLDDT, evaluar la similitud y diferenciación estructural.